

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA PROFESIONAL DE GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación de la expresión de genes de resistencia al
frío y metabolismo en condiciones de baja temperatura
de la cepa psicrotolerante *Acidithiobacillus ferrivorans*
PQ33 aislada de ambientes mineros altoandinos
peruanos**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Gregory GUERRA BIEBERACH

ASESOR

Pablo RAMÍREZ ROCA

Lima - Perú

2017

Esta tesis está dedicada a mis padres Luis y Elizabeth, por cuyo esfuerzo avanzo en
mis logros cada día.

A mis hermanos y amigos por sus palabras de ánimo

Al profesor Dr. Pablo Ramírez por la oportunidad otorgada y la experiencia invaluable.

A los profesores Dra. Martha Valdivia, Dra. Rina Ramírez y Mg. Erasmo Colona por su
ayuda desinteresada con el Qubit y el Nanodrop.

A mis compañeros del laboratorio y colegas de Suecia y Chile, cuyas
recomendaciones fueron de gran ayuda, Jordan, Anika, Robert, Fernando, Gustavo,
Alejandra, Mark y Pamela.

A Linda Díaz y David Huanco, siempre presentes en mi trabajo.

**EL PRESENTE ESTUDIO FUE FINANCIADO POR EL PROGRAMA NACIONAL DE
INNOVACIÓN PARA LA COMPETITIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD (INNÓVATE
PERÚ), DE ACUERDO AL CONTRATO 188-FINCYT-IB-2013**

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
1. SISTEMA ENZIMATICO DE LA BIOLIXIVIACION.....	4
A. MODELO DE LA OXIDACIÓN DE FE (II)	4
B. MODELO DE LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS INORGÁNICOS DE AZUFRE (RISC) EN <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	6
2. ADHERENCIA AL SUSTRATO	7
3. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL FRÍO EN <i>Acidithiobacillus</i>	8
4. PCR EN TIEMPO REAL.....	10
A. PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVO (QPCR)	11
B. GENES DE REFERENCIA.....	14
C. DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> O CEBADORES	14
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	17
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO	18
2. BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS Y DISEÑO DE <i>PRIMERS</i>	19
3. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	20
4. AISLAMIENTO DE ADN Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	21
5. DETERMINACIÓN EMPIRICA DE LA TEMPERATURA DE <i>ANNEALING</i> DE LOS <i>PRIMERS</i>	21

6. CURVA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA DEL PCR EN TIEMPO REAL.....	23
7. EXTRACCIÓN DE ARN	24
8. RETROTRANSCRIPCIÓN	27
9. PCR EN TIEMPO REAL.....	27
10. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE RT-QPCR.....	28
V. RESULTADOS.....	29
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	29
BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS Y DISEÑO DE PRIMERS.....	29
DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO ÓPTIMA.....	37
EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN	38
EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE LA CEPA <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> PQ33	57
EXTRACCIÓN DE ARN	59
VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA	60
PCR EN TIEMPO REAL	61
VI. DISCUSIÓN	64
VII. CONCLUSIONES	69
VIII. RECOMENDACIONES	70
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
X. ANEXO	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.-Enzimas del complejo de oxidación de Fe(II).....	5
Figura 2.-Diagramas genómicos de los operones “ <i>rus</i> ” y “ <i>petI</i> ”.....	5
Figura 3.-Ruta de oxidación de compuestos inorgánicos de azufre.....	6
Figura 4.-Sistemas enzimáticos bacterianos de producción de trehalosa.....	10
Figura 5.-Curva de eficiencia de amplificación en PCR en tiempo real.....	13
Figura 6.-Diseño de <i>primers</i> con el programa PrimerPremier6®.....	31
Figura 7.-Análisis de estructuras secundarias de <i>primers</i> en OligoAnalyzer®.....	31
Figura 8.-Simulaciones de homodímeros y heterodímeros en OligoAnalyzer®.....	32
Figura 9.-Simulación de estructura secundaria en mFold.....	33
Figura 10.-Electroforesis para los productos de reacción de los <i>primers</i> diseñados.	35
Figura 11.- Electroforesis para los productos de reacción de los <i>primers</i> diseñados	36
Figura 12.- Electroforesis para los productos de reacción de los <i>primers</i> diseñados	36
Figura 13.-Determinación de la temperatura de alineamiento óptima.....	37
Figura 14.-Curva amplificación del gen <i>rpoC</i>	38
Figura 15.-Curva de <i>melting</i> para el gen <i>rpoC</i>	38
Figura 16.-Curva estándar del gen <i>rpoC</i>	39
Figura 17.- Curva amplificación del gen <i>rRNA 16S</i>	39
Figura 18.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>rRNA 16S</i>	40
Figura 19.- Curva estándar del gen <i>rRNA 16S</i>	40

Figura 20.- Curva amplificación del gen <i>gyrB</i>	41
Figura 21.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>gyrB</i>	41
Figura 22.- Curva estándar del gen <i>gyrB</i>	42
Figura 23.- Curva amplificación del gen <i>era</i>	42
Figura 24.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>era</i>	43
Figura 25.- Curva estándar del gen <i>era</i>	43
Figura 26.- Curva amplificación del gen <i>alaS</i>	44
Figura 27.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>alaS</i>	44
Figura 28.- Curva estándar del gen <i>alaS</i>	45
Figura 29.- Curva amplificación del gen <i>rusA</i>	45
Figura 30.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>rusA</i>	46
Figura 31.- Curva estándar del gen <i>rusA</i>	46
Figura 32.- Curva amplificación del gen <i>dgc-I</i>	47
Figura 33.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>dgc-I</i>	47
Figura 34.- Curva estándar del gen <i>dgc-I</i>	48
Figura 35.- Curva amplificación del gen <i>dgc-II</i>	48
Figura 36.- Curva estándar del gen <i>dgc-II</i>	49
Figura 37.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>dgc-II</i>	49
Figura 38.- Curva amplificación del gen <i>treZ</i>	50
Figura 39.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>treZ</i>	50

Figura 40.- Curva estándar del gen <i>treZ</i>	51
Figura 41.- Curva amplificación del gen <i>treY</i>	51
Figura 42.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>treY</i>	52
Figura 43.- Curva estándar del gen <i>treY</i>	52
Figura 44.- Curva amplificación del gen <i>treS</i>	53
Figura 45.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>treS</i>	53
Figura 46.- Curva estándar del gen <i>treS</i>	54
Figura 47.- Curva amplificación del gen <i>glgX</i>	54
Figura 48.- Curva de <i>melting</i> para el gen <i>glgX</i>	55
Figura 49.- Curva amplificación del gen <i>glgX</i>	55
Figura 50.- Cinética de crecimiento de <i>A. ferrivorans</i> PQ33 a 5°C.....	57
Figura 51.- Parámetros de la cinética de crecimiento de <i>A. ferrivorans</i> PQ33 a 5°C	58
Figura 52.- Electroforesis de ARN de <i>A. ferrivorans</i> PQ33	59
Figura 53.- Valores de estabilidad genética “M” para genes de referencia.....	60
Figura 54.- Valores de expresión relativa de los genes analizados en REST2009®.....	62
Figura 55.- Diagrama de cajas y bigotes para los valores de expresión relativa de los genes analizados.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1.- Composición del medio de crecimiento usado en este estudio.....	18
Tabla 2.- Reactivos y concentraciones usados para PCR tipo Veriflex™.....	22
Tabla 3.- Programa de amplificación PCR tipo Veriflex™.....	22
Tabla 4.- Reactivos y concentraciones usados en el PCR de curva estándar	24
Tabla 5.- Programa de amplificación del PCR en tiempo real para la curva estándar.....	24
Tabla 6.- Características de posición genómica de los genes utilizados	30
Tabla 7.- Valores de energía libre de Gibbs en las estructuras secundarias de las secuencias de <i>primers</i> utilizadas.....	34
Tabla 8.- Cuadro general descriptivo de principales parámetros de los <i>primers</i> diseñados para este estudio.....	56

RESUMEN

La biolixiviación es el uso de microorganismos capaces de solubilizar minerales en la industria minera, esta biotecnología es favorable al medio ambiente y a la actividad económica debido a que no genera poluciones atmosféricas y es poco costosa. En el Perú, la aplicación de esta tecnología en zonas alto andinas, donde se concentran la mayoría de yacimientos mineros importantes, es difícil debido a que las condiciones de baja temperatura existentes en esos entornos impiden que los microorganismos generalmente utilizados en la biolixiviación crezcan y realicen su metabolismo de manera eficiente.

Para resolver esta problemática se hace necesaria la búsqueda de cepas resistentes al frío que puedan iniciar eficientemente los procesos biomineros así como conocer sus mecanismos de resistencia y oxidación de minerales a nivel molecular, iniciando así la ruta hacia posibles aplicaciones a nivel de ingeniería genética, además de permitirnos conocer los recursos genéticos de nuestra biodiversidad.

El presente estudio se llevó a cabo con la cepa psicotolerante *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 aislada de Cerro de Pasco. Se analizaron los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo del ión ferroso a ión férrico involucrado en la biolixiviación en condiciones de baja temperatura (5°C), así como los niveles de expresión de genes que han sido señalados en investigaciones anteriores como candidatos a conferir resistencia a condiciones de baja temperatura (genes pertenecientes al operon de síntesis de la trehalosa y diguanilato ciclasas), como condición control, se tomó el crecimiento de esta cepa a temperatura ambiente (21°C), lo más cercano posible a la temperatura de crecimiento ideal (22°C). Para el análisis de los niveles de expresión, se usaron *primers* diseñados por el investigador para genes de referencia, genes de metabolismo y genes de resistencia al frío. La información base

para la síntesis de estos *primers* fue el genoma de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33, secuenciado por nuestro laboratorio.

El análisis de los niveles de transcritos para los genes de referencia evidenció una expresión invariable en ambas condiciones, validando 3 genes (*rpoC*, *gyrB* y *alaS*) como genes de referencia añadiendo una nueva herramienta metodológica a la investigación en esta especie. Los genes candidatos a estar involucrados en la adaptación a bajas temperaturas, los genes de la vía de síntesis de trehalosa: trehalosa sintasa (*treS*) y trehalosa oligosil tetrahidrolasa (*treZ*) no mostraron sobreexpresión bajo condiciones de baja temperatura, de hecho, *treS* mostró sobreexpresión a 21°C. Asimismo, se analizaron dos genes relacionados con la síntesis de exopolímeros y la formación de “biofilm” (Diguanilato ciclasas, DGC) sobreexpresados a condiciones de 21°C. También se analizaron dos genes metabólicos relacionados con la oxidación del ion ferroso (genes *rusA* y *rusB*), que no mostraron ningún cambio de expresión significativo en ninguna de las condiciones. Estos resultados muestran congruencia con los últimos estudios sobre la expresión génica de *Acidithiobacillus ferrivorans* con enfoques de transcriptómica, lo que demuestra que los genes candidatos clásicos de adaptación al frío (genes de síntesis de trehalosa) no muestran cambios significativos en condiciones de baja temperatura, el sistema genético de esta especie estaría constantemente adaptado a la resistencia al frío, reforzando la hipótesis de su clasificación como especie euripsicrófila; o de lo contrario podrían haber otros mecanismos no clásicos de resistencia al frío.

Palabras Clave: *Acidithiobacillus ferrivorans*, Bajas temperaturas, RT-qPCR, Expresión genética, Psicrotolerancia, Biolixiviación.

ABSTRACT

Cold resistant strains of acidophilic iron-oxidizing microorganisms are important in biotechnological applications especially in leaching piles where low temperatures are predominant and may interfere with the efficiency of bioleaching rates. Euripsychrophile species *Acidithiobacillus ferrivorans* has been reported as a primary active microorganism in leaching piles at low temperatures. These microorganisms are known to accelerate the dissolution of sulfur minerals, releasing important metal ions. Because this process is exothermic, the leaching pile will increase its temperature, leading to the thriving of more efficient, thermotolerant microorganisms. Until recently, little has been known about the molecular adaptations of this microorganism to low temperatures. Furthermore, no molecular studies using real time PCR methodology have been performed, or reference genes have been validated in this species.

We have performed a real time PCR relative quantification on candidate genes supposed to have a role in low temperatures adaptations and metabolic efficiency. A total of 10 genes were analyzed, 3 genes (*rpoC*, *gyrB* and *alaS*) were validated as reference genes and *16S/rna* was excluded.

The candidate cold adaptation genes analyzed, trehalose synthesis pathway genes: trehalose synthase (*treS*) and trehalose oligosil tetrahydrolase (*treZ*) showed no overexpression under low temperature conditions, in fact *treS* showed overexpression at 21°C.

Two genes related to exopolymer synthesis and “biofilm” formation (Diguanylate cyclases, DGC) were also analyzed being overexpressed at 21°C conditions. Two metabolic related genes involved in ferrous Iron oxidation (*rusA* and *rusB* genes) were also analyzed, showing no significant change for *rusA* and no expression at all of *rusB* gene in any of the conditions. This results show congruency with the last studies about gene expression of *Acidithiobacillus ferrivorans* with transcriptomics approaches, showing

that the classical candidate genes for cold adaptation (trehalose synthesis genes) show no change and there might be other mechanisms involved.

Keywords: *Acidithiobacillus ferrivorans*, gene expression, RT-qPCR, low temperatures, psychrotolerance, bioleaching.

I. INTRODUCCIÓN

La biominería es la aplicación industrial que se basa en el uso de microorganismos acidófilos que oxidan Fe(II) y compuestos inorgánicos de azufre reducidos (RISC) con el fin de recuperar metales valiosos a partir de minerales o concentrados mineros, solubilizándolos (biolixivación) u oxidando las menas para hacerlas menos refractarias a los procesos químicos subsiguientes (bio-oxidación) (Schipper *et al.*, 2013); generalmente, ambos fenómenos son mediados a través del ataque oxidativo de los microorganismos hacia Fe(II) y compuestos inorgánicos de azufre (RISC), liberando Fe(III) y protones que actúan directamente sobre el mineral, predominantemente sulfuros metálicos permitiendo obtener metales valiosos como oro, cobre, zinc, uranio, entre otros (Vera *et al.*, 2013).

La biominería es un proceso económico así como respetuoso del medio ambiente al compararse con otros procesos de concentración y flotación química; presenta la capacidad exclusiva de recuperar metales valiosos de sulfuros metálicos, óxidos y polimetales de baja ley y opera a temperaturas y presiones mucho más bajas (el inicio del proceso puede darse a temperatura ambiente fácilmente, a presión atmosférica en cada momento) que otras tecnologías de procesamiento y por lo tanto requiere mucho menos energía (Rawlings y Johnson, 2010). Los mismos autores concluyen que se elimina la necesidad de agregar energía al sistema en operaciones de tanque agitado, las operaciones de pilas y montículos de lixiviación no necesitan mayor control térmico, ya que al subir la temperatura, se da una sucesión de microorganismos que termina en la predominancia de termotolerantes y termófilos. Asimismo, debido al uso de bacterias autótrofas que fijan CO₂ se produce un mínimo de emisiones de invernadero.

Generalmente, los organismos acidófilos que oxidan compuestos de azufre inorgánico y Fe(II) utilizados para esta biotecnología presentan características mesófilas, termotolerantes o termófilas, y en un cultivo mixto, estos microorganismos se suceden

dependiendo de las temperaturas alcanzadas en la pila de lixiviación o tanque biorreactor (Kupka et al., 2007). A pesar de las ventajas que presenta esta biotecnología, este tipo de organismos no son eficientes en condiciones de bajas temperaturas y no pueden iniciar la oxidación bacteriana a un ritmo cuyo beneficio justifique el uso de esta biotecnología en las zonas altoandinas de Perú, donde se concentran la mayoría de yacimientos mineros importantes, debido a las condiciones de baja temperatura existentes en esos entornos.

Sin embargo la presencia de oxidación a ritmos acelerados de minerales sulfurosos y ferrosos en locaciones similares y de baja temperatura, indica la presencia de microorganismos capaces de realizar los procesos biolixivantes, tales como *Acidithiobacillus ferrivorans* (Escobar et al., 2009) con potencial de uso para esta biotecnología.

Para resolver la problemática planteada se hace necesaria la búsqueda de cepas resistentes al frío que puedan iniciar eficientemente los procesos biomineros así como conocer sus mecanismos de resistencia y oxidación de minerales a nivel molecular, y así establecer posibles aplicaciones a nivel de ingeniería genética y conocer los recursos genéticos de nuestra biodiversidad.

II. MARCO TEÓRICO

El estado del arte en el conocimiento de organismos psicrotolerantes relacionados a actividad biolixiviadora es escasa, como resalta Mykzytuk *et. al.*, (2010): “La mayoría de los microorganismos utilizados en procesos de biolixiviación presentan características mesófilas y termotolerantes; varios estudios han reportado cepas psicrotolerantes de *Acidithiobacillus ferrooxidans* que pueden oxidar iones ferrosos a temperaturas muy bajas, en el rango de 2-5°C, mientras que varias cepas mesófilas no crecen a una temperatura más baja que 10°C (Ferroni *et al.*, 1986; Leduc *et al.*, 1993; Kupka *et al.*, 2007). Actualmente muchas de estas cepas psicrotróficas o psicrotolerantes se han reclasificado como *A. ferrivorans* sp. nov. (Hallberg *et al.*, 2010)”.

La biolixiviación en pila en bajas temperaturas es utilizada en Talvivaara Mining Company, Finlandia, para la recuperación de níquel, cobre, zinc y cobalto; donde las temperaturas de invierno pueden llegar a -30°C (Lilqjevist, 2012), a pesar de estas temperaturas externas, la temperatura dentro de la pila llega a los 80°C, generando un gradiente en la pila de biolixiviación, donde se postula que los microorganismos psicrotolerantes ejercen biolixiviación en las capas más externas. Hoy, aproximadamente 50000 toneladas de níquel y aproximadamente 90000 toneladas de zinc son producidas anualmente (Talvivaara Mining Company, 2011).

En el Perú, la mayoría de yacimientos mineros explotados se encuentran en regiones de gran altitud y bajas temperaturas (Abanto *et al.* 2013), por lo que el estudio de cepas psicrotolerantes es de importancia biotecnológica para su aplicación exitosa en los procesos de biolixiviación.

1. SISTEMA ENZIMATICO DE LA BIOLIXIVIACION

A. MODELO DE LA OXIDACIÓN DE FE (II)

Tal como señala Bonnefoy en sus revisiones (Bonnefoy *et al.*, 2012); (Holmes y Bonnefoy, 2007) este modelo ha sido estudiado en *Acidithiobacillus ferrooxidans* y está basado en evidencia bioquímica, genética molecular, bioenergética, bioinformática y de genómica funcional, la presencia de los mismos operones metabólicos y la cercanía genética y fisiológica de ambas especies indican el mismo rol para este sistema proteico en *Acidithiobacillus ferrivorans* (ver Figura 1); Los electrones extraídos de la oxidación de Fe(II) por el citocromo embebido en la membrana externa, el citocromo c (Cyc2), pasan a la proteína acomplejada con cobre denominada Rusticianina (R). Desde esta proteína los electrones pueden tomar un camino de bajo potencial (Downhill) para reducir O₂ en agua, pasando por el citocromo c4 (Cyc1) y el complejo tipo citocromo oxidasa aa3. Asimismo se describe una vía arriba del potencial (*Uphill*) hacia el complejo NADH1 vía el citocromo c4 (CycA1), el complejo bc1 y las quinonas asociadas a membrana. La energía para guiar a los electrones en contra de la gradiente termodinámicamente desfavorable, viene posiblemente del flujo hacia el interior de los protones debido a la fuerza de gradiente generada por la diferencia de concentraciones de protones dentro de la célula (pH 6.5) y fuera (pH 1.5 – 2). La gran cantidad de biomasa correspondiente a la proteína Rus (5% de la biomasa total según Cox, 1978) se debe a que Rus es necesaria para mantener a la proteína Cyc2 en estado totalmente oxidado para poder facilitar la oxidación del Fe(II) externo (Vera *et al.*, 2013).

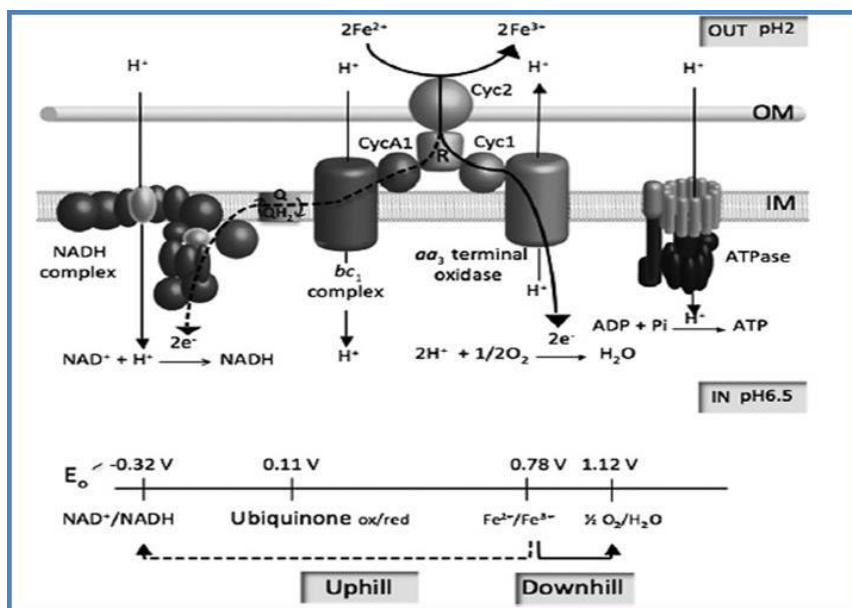


Figura 1. Enzimas del complejo de oxidación de Fe(II) de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ubicadas en pared, espacio intermembrana y membrana celular de manera agrupada; a la derecha de la proteína de oxidadora Cyc2 se encuentran dispuestas las proteínas encargadas de la ruta *Downhill*, cuyo potencial positivo favorece el traspase automático de los electrones, a la izquierda, las enzimas de la ruta *Uphill* necesitan de la energía generada por el flujo de la gradiente de protones hacia el interior, a través del complejo bc1 para poder reducir el NAD necesario para la fijación de carbono y nitrógeno (Holmes y Bonnefoy, 2007).

Tanto en el genoma de *Acidithiobacillus ferrooxidans* como en el de *Acidithiobacillus ferrivorans* existen operones que codifican para las proteínas antes mencionadas (ver Figura 2), el operón Rus codifica las proteínas necesarias para la vía *Downhill* y a Cyc2 que interviene en ambas vías; mientras que el operón *petI* codifica para las proteínas de la vía Uphill.

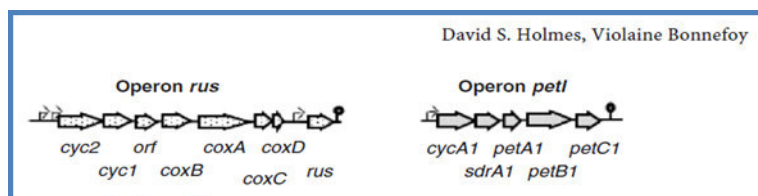


Figura 2. El operón rus codifica las proteínas involucradas en la vía *Downhill* mientras que el operón *petI* codifica a las proteínas involucradas en la vía *Uphill*, ambos operones presentan un nivel transcripcional mucho mayor en hierro que en azufre elemental. (Holmes y Bonnefoy 2007). Es de importancia notar en *Acidithiobacillus ferrivorans* y algunas cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* la existencia de proteínas alternativas a Rus, como son Hipip y RusB (Amouric *et al.*, 2010); (Bonnefoy y Holmes, 2011).

B. MODELO DE LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS INORGÁNICOS DE AZUFRE (RISC) EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*

La elucidación de una ruta para la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre (RISC) en el género *Acidithiobacillus*, es aún una tarea compleja debido a que existen varias proteínas redundantes y accesorias; sin embargo, se conoce de forma parcial cual sería la localización de las enzimas más importantes del proceso, descritas en la Figura 3 (Quatrini *et al.*, 2009).

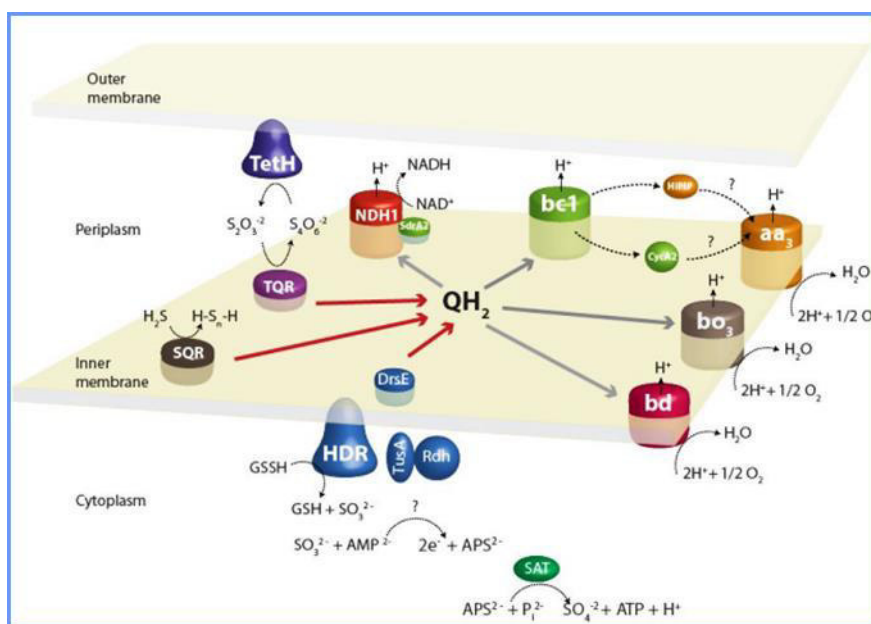


Figura 3. Se describe la ruta de oxidación de los compuestos inorgánicos de azufre, se observa la presencia de varias enzimas que interactúan con los compuestos en el espacio intermembrana y citoplasmático. Ubicación de las proteínas: en la membrana exterior que mira hacia el periplasma (reductasa tetratiónato, TethH), en el periplasma (proteína hierro-azufre de alto potencial, HiPIP), unido a la membrana citoplasmática en el lado periplásmico (citocromo c, CycA2), en la membrana citoplasmática (quinona sulfuro reductasa (SQR), quinona reductasa tiosulfato (TQR), complejo BC1, NADH complejo I, bd y oxidasas terminales BO3) y en el citoplasma (reductasa heterodisulfuro (HDR), y ATP sulfurilasa (SAT)). El operón *petII* codifica a los genes del segundo complejo *bc1*, *sdra2*, *hipip* y citocromo c4 (Quatrini *et al.*, 2009).

El azufre insoluble es convertido a sulfato de sulfano (GSSH) en el citoplasma, que luego se transfiere a la reductasa heterodisulfuro (HDR) a través de una cascada de

transferasas de azufre (DSRE, Tusa y Rh). Los electrones procedentes de sulfuro (H_2S), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) o sulfato sulfano (GSSH) se transfieren a través del conjunto de proteínas (QH2) ya sea directamente a las oxidasas terminales bd o bo3, o indirectamente a través de un complejo bc1 y citocromo c (CycA2) para la reducción del O_2 a H_2O ; o a una proteína hierro-azufre de alto potencial (HiPIP) a la oxidasa aa3 donde la reducción de O_2 se lleva a cabo, o puede seguir una ruta diferente hacia el complejo NADH para generar poder reductor (Quatrini *et al.*, 2009).

2. ADHERENCIA AL SUSTRATO

Otro mecanismo importante en el metabolismo de *Acidithiobacillus* es el paso del modo de vida planctónico a uno sésil a través de la secreción de sustancias extracelulares poliméricas (EPS) que posibilitan la formación de *biofilm*, permitiendo que las células bacterianas se adhieran al sustrato, lo que aumenta el metabolismo y la lixiviación de minerales (Vera *et al.*, 2013). En muchas bacterias los niveles intracelulares de c-di-GMP son los que regulan el paso de vida móvil a uno de adherencia y colonización en comunidades.

En los organismos eucariotas, c-AMP y c-GMP son segundos mensajeros, y se creía que en el reino procarionte solo c-AMP se encontraba presente como segundo mensajero (Kolb *et al.*, 1993). En el 2004, Simm *et al.*, fueron los primeros que describieron al c-di-GMP como un novedoso segundo mensajero en el reino procariota, al realizar un análisis genómico de varias especies, lo que permitió encontrar proteínas con actividad diguanilato ciclasa. En ellas resaltan los dominios conservados GGDEF y EAL como componentes esenciales y unidades sintetizadora/degradadora de di-GMP cíclico. También se comprobó experimentalmente que este metabolito está involucrado en el paso del estadio sésil al móvil y viceversa en muchos microorganismos. GGDEF es una dinucleótido ciclasa (DGC), y el dominio EAL es una dinucleótido cíclico fosfodiesterasa (PDE).

En los genomas secuenciados para el género *Acidithiobacillus* se pueden encontrar varios ORFs codificantes para diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas. En el 2009, Castro *et al.*, identificaron y caracterizaron varios de estos ORFs en las especies *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, además de esto, se pudo comprobar mediante RT-qPCR que los genes codificantes para las DGCs y PDEs eran expresados por estas bacterias en varios sustratos, sugiriendo que la generación de c-di-GMP está implicada en la generación de *biofilm* y sus ventajas metabólicas de adherencia al sustrato que esto conlleva.

Ruiz *et al.*, (2011) pudieron medir los niveles intracelulares de c-di-GMP en *Acidithiobacillus ferrooxidans* cuando esta bacteria se encontraba en estadio de *biofilm*, observando una elevación notable de este metabolito, esta evidencia junto a la dada por Castro *et al.* 2015, que estableció que en *Acidithiobacillus caldus*, la enzima Diguanilato Ciclasa (DGC) es la encargada de producir c-di-GMP e iniciar la cascada de señales para inducir a la formación de la comunidad de *biofilm*, ya que la mutación defectiva del gen para la enzima DGC en la cepa ($\Delta c1319$) de *Acidithiobacillus caldus*, mostró que la adherencia al sustrato era severamente reducida en esta cepa.

Bajo estas evidencias se establece que la función de la enzima Diguanilato ciclasa y la elevación del metabolito que produce tiene un rol principal en la adherencia al sustrato tanto para las bacterias en el género *Acidithiobacillus* así como para muchas otras bacterias.

3. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL FRÍO EN *ACIDITHIOBACILLUS*

Se ha reportado un mecanismo de defensa ante el descenso de la temperatura que propone el aumento de la rigidez de la membrana en *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Mykytczuk *et al.*, 2010). A una temperatura de 5°C estas cepas psicrotolerantes han mostrado un cambio exclusivo de la combinación de ácidos grasos insaturados en la membrana. En ellas disminuyó el ácido dodecanoico (12:0) y se incrementó el ácido cis- $\Delta 9$ -hexadeconico (16:1 w7c) a 5°C.

El trabajo proteómico de Mykytczuk *et al.*, (2011) analizó la expresión global de proteínas de una cepa mesófila y otra psicrotolerante de *Acidithiobacillus* en condiciones de temperatura normal y de baja temperatura (25-15°C para la cepa mesófila, 25-5°C para la cepa psicrotolerante) encontrando sobreexpresadas proteínas que están involucradas en muchas funciones de metabolismo de energía y carbono, transcripción, destino proteínico y protección contra especies reactivas de oxígeno. En dicho trabajo se hace énfasis en la expresión de las proteínas codificadas por los genes *rusA*, *usp*, *groEL*, *motA*-*tolQ* - *EXBb* y otros, que participan en el metabolismo y la oxidación del sustrato (genes *rus*) chaperoninas (*groEL*) y transportes de membrana (*mot* - *tolQ* - *EXBb*, etc) que están involucrados en los mecanismos de adaptación al frío de *A. ferrooxidans*. Muchas de estas respuestas son comunes en bacterias, mientras que otras exclusivas de *Acidithiobacillus*.

Una de las características más saltantes que indican una adaptación al frío en la especie *Acidithiobacillus ferrivorans* es la presencia de tres sistemas enzimáticos diferentes para la producción de las moléculas de trehalosa en el genoma secuenciado de esta especie (Hallberg *et al.*, 2010). La trehalosa es una molécula importante en la resistencia al frío, actúa como soluto osmoprotector y crioprotector en una gran variedad de microorganismos. En consorcios microbianos de aguas ácidas a bajas temperaturas se encontraron a nivel metagenómico los 5 sistemas conocidos en bacterias y arqueas de producción de trehalosa (Liljeqvist *et al.*, 2015) que indica que las especies bacterianas que proliferan en esos ambientes fríos utilizan diferentes sustratos para obtener trehalosa, señalando la importancia de este soluto en esos ambientes de baja temperatura (ver Figura 4).

De los cinco sistemas conocidos de producción de trehalosa, dos están presentes en el genoma de la *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 secuenciado, ensamblado y anotado en el laboratorio de microbiología molecular y biotecnología, en forma 4 ORFs codificando para 4 enzimas diferentes establecidas en un operón:

Operón Trehalosa en *Acidithiobacillus ferrivorans*:

- *treS*: trehalosa Sintasa
- *treY*: trehalosa Maltoligosil transferasa
- *treZ*: trehalosa oligosil tetrahidrolasa
- *glgX*: Enzima desramificadora de glucógeno

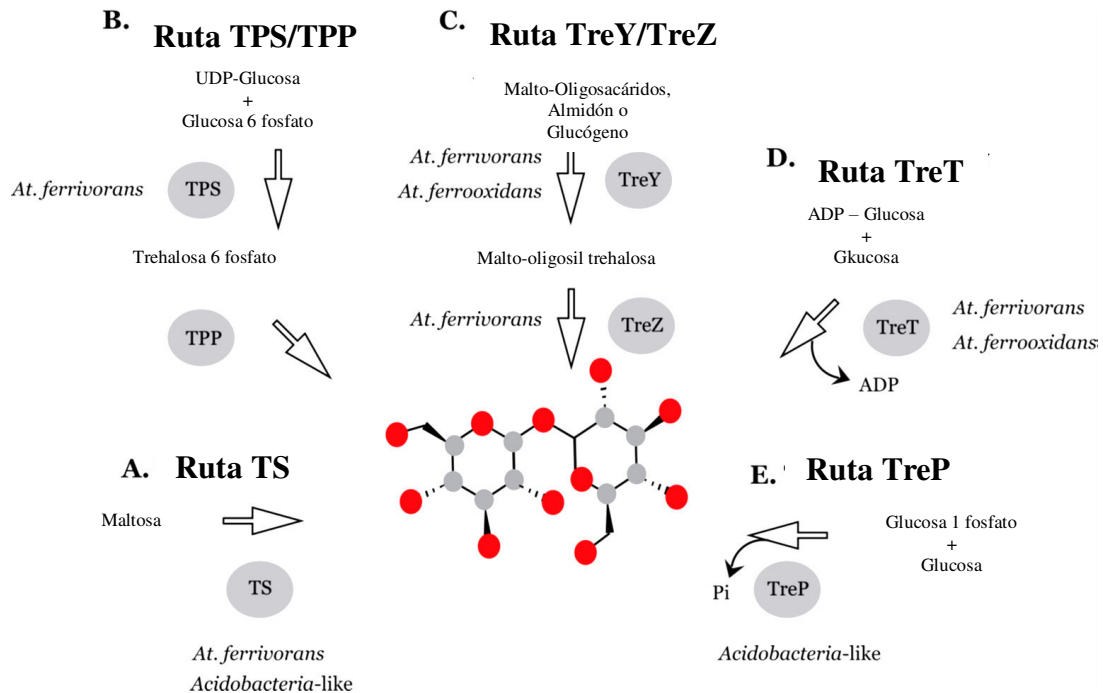


Figura 4. Los cinco sistemas enzimáticos utilizados por microorganismos para la producción de trehalosa, se hipotetiza por análisis metagenómicos que algunas clonas genómicas pertenecientes a *Acidithiobacillus ferrivorans* poseerían hasta 3 sistemas enzimáticos de producción de trehalosa. En el genoma de la cepa PQ33 objeto de estudio, se encontraron los genes necesarios para dos de los sistemas enzimáticos, la vía TreZ/TreY y la vía TS aparte de una enzima desramificadora de glucógeno adicional. Fuente: Liljeqvist *et al.*, 2015.

4. PCR EN TIEMPO REAL

El PCR en tiempo real es una plataforma de detección y cuantificación que surge como una variación del PCR convencional, donde 2 hebras de DNA son generadas

enzimáticamente a partir de una hebra inicial (templado); esta afinidad de secuencia depende del *primer* o cebador diseñado específicamente para la secuencia del templado la que se hibrida mediante puentes de hidrógeno a los extremos de la secuencia a amplificar (Mullis *et al.*, 1986). La diferencia crucial del PCR en tiempo real contra el PCR convencional es la capacidad de detección del incremento de las hebras de ADN en cada ciclo de amplificación gracias a fluoróforos que se unen al ADN sintetizado, estos fluoróforos emiten fotones al unirse con el ADN, a mayor ADN en cada ciclo de replicación, la señal emitida se incrementará de manera proporcional, generando una curva de amplificación visible. Esta curva en el PCR en tiempo real permite obtener datos de cantidad de hebras en cada ciclo, dándonos la capacidad de inferir la cantidad inicial de ADN templado. (Higuchi *et al.*, 1993) idearon el método con el bromuro de etidio (EtBr) como fluoróforo.

El poder inferir la cantidad inicial de templado sirve para analizar la expresión de genes: Se puede determinar la cantidad inicial de RNA mensajero de un gen de interés usando los transcritos como templado para la retrotranscripción y posteriormente, con el ADN complementario obtenido, realizar el PCR en tiempo real, analizando las dinámicas de las curvas de amplificación, se puede determinar y cuantificar los niveles de transcritos para los genes específicos seleccionados para la investigación (Gibson *et al.*, 1996).

A. PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVO (QPCR)

El PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR) es aquél que utiliza la curva de amplificación y los valores umbrales o valores Ct para determinar la cantidad inicial de templado (cDNA o RNA); existen dos tipos; el qPCR de cuantificación relativa y el qPCR de cuantificación absoluta, ambos usan el valor Ct para determinar la cantidad inicial de templado (Bustin *et al.*, 2005).

Según las normativas para el uso correcto de datos de experimentos de PCR en tiempo real (MIQE Guidelines, Bustin *et al.*, 2009) los elementos esenciales de un análisis de PCR cuantitativo son:

VALOR CT O VALOR UMBRAL (CT)

Es el valor de ciclo (expresado en número de ciclo y sus decimales) en el cual la señal de fluorescencia de la curva de amplificación supera el valor umbral calculado para el experimento, por debajo de este valor umbral, la fluorescencia derivada de la amplificación no es discernible del ruido de fondo.

CURVA ESTÁNDAR

Es un conjunto de reacciones de PCR con cantidades iniciales conocidas de ADN templado generadas mediante diluciones seriadas, permitiendo establecer valores Ct para cada punto de la dilución sometido a PCR en tiempo real y así poder inferir la cantidad inicial de muestra. Una variante de la curva estándar será usada para establecer la eficiencia de la amplificación del PCR según el *primer* o cebador en uso.

EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN (E)

En el caso ideal de reacción de PCR, cada hebra de ADN debe duplicarse en la etapa exponencial de la curva de amplificación, dando una gráfica exponencial en base 2.

En base a esta suposición la eficiencia de amplificación (E) es un valor expresado en porcentajes de cuanto se acerca la amplificación real al valor ideal, obtenido a partir de la fórmula $E\% = 10^{(-1/\text{pendiente de la curva estándar})} \times 100$. Una eficiencia aceptable para experimentos de PCR en tiempo real se encuentra entre 90 y 100% aceptando hasta valores de 85%.

Los factores más importantes que determinan la eficiencia son el grado de pureza del ADN en la reacción de PCR y el correcto diseño de los *primers* a usar, siendo este último factor crucial para el correcto funcionamiento del PCR.

CURVA DE EFICIENCIA

Existe un tipo especial de curva estándar que se usa para determinar la eficiencia de la reacción, en este caso, cada punto de reacción tiene una concentración distinta del

templado que se realiza a través de una dilución estándar seriada (1:5 o 1:10), gracias a la magnitud de dilución se sabe que un *primer* de alta eficiencia (que tiene la capacidad de duplicar la cantidad de amplicones en cada ciclo de PCR) generará un patrón homogéneo de separación entre dos muestras con valores conocidos de la diferencia entre Ct según la concentración, esta diferencia de Ct se puede describir en la Figura 5, como sigue:

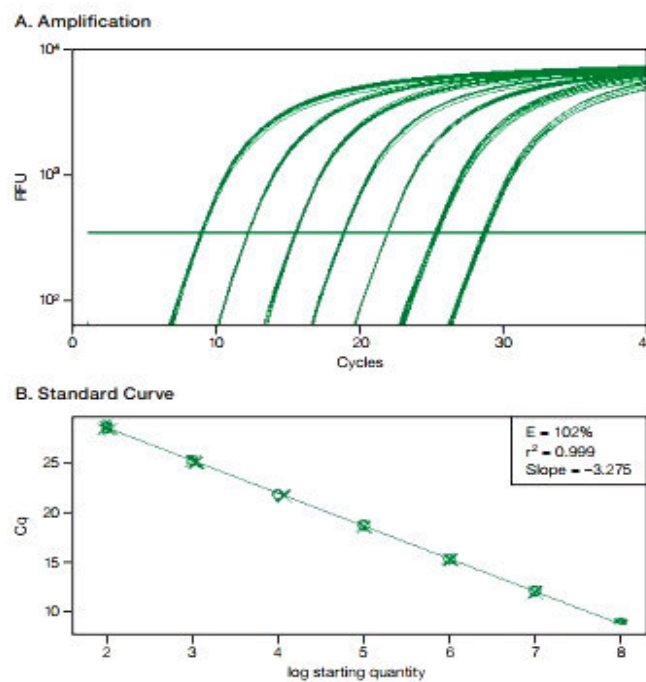


Figura 5. A. curvas de amplificación equidistantes de las diluciones seriadas, la línea indica el *threshold* o umbral sobre el cual la intensidad del fluoróforo es significativa, el punto donde la curva de amplificación cruza esa línea es el valor Ct o simplemente Ct. **B.** Los valores de Ct (o Cq, como fue denominada antes de las pautas MIQE) son distribuidos en relación al logaritmo de la cantidad de templado por cada dilución, de acuerdo a la ecuación para la curva, una pendiente de -3.3 es igual al 100% de eficiencia (Taylor *et al.*, 2010).

B. GENES DE REFERENCIA

En la cuantificación relativa por PCR en tiempo real no existe la posibilidad de normalizar los resultados del experimento de manera artificial (es decir, depurar los resultados obtenidos, eliminando la variación que pueda existir por factores exógenos al experimento en cada réplica) ya que no existe un marcador o reactivo químico que pueda ingresar a la célula en igual número por cada condición, que perdure durante todo el proceso de tratamiento experimental y que en el análisis de resultados se muestre con alto grado de confiabilidad en las réplicas, permitiendo normalizar los resultados frente a este calibrador.

Frente a esta problemática, se ideó el concepto de genes de referencia: Idealmente, los genes de referencia se transcriben de manera constante e idéntica en cada condición experimental, posibilitando su uso como calibrador para la normalización de los resultados. En la práctica, para el correcto sustento estadístico, 3 o más genes de referencia validados deben ser usados.

C. DISEÑO DE *PRIMERS* O CEBADORES

Un buen diseño de *primers* depende de varios parámetros que el investigador debe asegurar, la deficiencia en el diseño de *primers* es la causa principal de una pobre eficiencia de amplificación dejando al par de *primers* inservibles para su uso en experimentos de qPCR.

Los principales parámetros que se deben tomar en cuenta según Thornton *et al.*, (2011) son:

DÍMEROS DE PRIMERS (HOMODÍMEROS Y HETERODÍMEROS)

Se debe cuidar que los *primers* no se hibriden consigo mismos o con el primer acompañante en el extremo 3' ya que esto dejaría una estructura de doble cadena con un extremo 3'-OH que posibilita la polimerización por la DNA polimerasa, generando

ADN de doble cadena a partir de los *primers*, este nuevo amplicón competiría con el amplicón del gen a estudiar, generando una baja eficiencia. La energía libre de Gibbs límite para este tipo de interacción molecular es de -5 Kcal/mol para interacción de *primers* en la parte interna de la secuencia y de -3 Kcal/mol en los extremos.

HAIRPINS O ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS PRIMERS

Como oligonucleótidos de cadena simple, los *primers* generarán estructuras secundarias, las cuales de ser demasiado fuertes, impedirán el correcto alineamiento del *primer* a su secuencia “*target*”, alterando negativamente la eficiencia de la reacción.

TAMAÑO Y ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL AMPLICÓN

Al diseñar *primers* se debe tener en cuenta la zona genómica donde se hibridarán, dando un amplicón entre 50 y 150 pares de bases nucleotídicas, ya que un tamaño pequeño es propicio para tener mejores eficiencias. Asimismo, la estructura secundaria que adquiere el amplicón debe ser la menos fuerte posible, con una energía libre máxima de -10 Kcal/mol. Si la estructura secundaria del amplicón es muy fuerte, se podría inhibir la correcta amplificación generando amplicones incompletos, alternando negativamente la eficiencia de reacción.

Es importante mencionar que, para garantizar una buena eficiencia de reacción, la temperatura óptima de *annealing* de cada primer debe determinarse empíricamente. La mejor temperatura de *annealing* es aquella donde la fluorescencia pasa el Ct más rápido y alcanza la intensidad más alta entre las temperaturas ensayadas.

Seguida a la reacción del PCR en tiempo real se realiza generalmente un análisis post PCR conocido como curva de “*melting*”, esta curva es una gráfica de la liberación fluoróforo unido a los amplicones y se obtiene a partir del incremento paulatino de la temperatura de los amplicones obtenidos lo que ocasiona que las cadenas de ADN se desenvuelvan y separen, liberando el fluoróforo. A medida que se va realizando la curva de *melting* se encuentra un punto de inflexión que coincide con la temperatura de *melting*

de los amplicones. Ya que cada amplicon tiene una curva específica de *melting*, se puede determinar cuántas especies diferentes de amplicones se han generado en una reacción, estableciendo contaminación en la reacción inicial o si es que hay artefactos que pueden estar inhibiendo la eficiencia de reacción como los dímeros de *primers*, que generarían su propia curva de *melting* en el proceso.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La cepa psicotolerante *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 posee genes clave en la resistencia a las bajas temperaturas y metabolismo en estas condiciones, cuya adaptación radica en la sobreexpresión de los mismos permitiéndole sobrevivir en climas fríos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de mecanismos genéticos - moleculares de resistencia y metabolismo al frío en la cepa *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 aislada de una zona altoandina de Perú con potencial biotecnológico en biominería.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar la expresión de genes candidatos a conferir resistencia a bajas temperaturas en *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 mediante cuantificación relativa RT-qPCR.
- b. Caracterizar la expresión de genes implicados en el metabolismo de la oxidación del hierro en condiciones de baja temperatura en *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 mediante cuantificación relativa RT-qPCR.
- c. Establecer un conjunto de genes de referencia para la especie *Acidithiobacillus ferrivorans* en condiciones de baja temperatura vs. temperatura ambiente que permitan validar de manera confiable los resultados obtenidos mediante la cuantificación relativa RT-qPCR.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Para este estudio, la cepa psicotolerante *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 previamente aislada (Ccorahua *et al*, 2017) estrió en medio sólido de agar FeO modificado (Abanto *et al.*, 2013), y se seleccionó una única colonia para asegurar la clonalidad genética. Se utilizaron las siguientes condiciones experimentales para el análisis de expresión génica: crecimiento en medio líquido 9K (Silverman y Lundgren, 1959) con una agitación de 200 rpm en cada condición ensayada (5°C y 21°C) durante tres cultivos sucesivos para asegurar la actividad metabólica óptima de la cepa; el cultivo siguiente en cada condición se realizó por triplicado (tres réplicas biológicas), y la extracción de ARN se llevó a cabo durante la fase logarítmica.

Tabla 1. Composición del medio de crecimiento usado en este estudio

Composición del medio Silverman Lundgreen 9K suplementado con hierro:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g/L
KCl	0.1 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
MgSO _{4.7} H ₂ O	0,5 g/L
Ca(NO ₃) ₂	0.01 g/L
FeSO ₄	42.2 g/L
*Ajustar el pH hasta 1.6 con H ₂ SO ₄ , Llevar a un litro con agua destilada.	

2. BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS Y DISEÑO DE *PRIMERS*

Las secuencias de los 12 genes a analizar se obtuvieron a partir de la secuencia genómica disponible para *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 (Ccorahua *et al.*, 2017) se usaron las bases de datos del NCBI, utilizando la herramienta *Genome*, ubicando los genes anotados en el genoma secuenciado. Los genes candidatos a ser genes de referencia fueron: *rpoC*, que codifica la subunidad β' de la ARN polimerasa bacteriana, *alaS* que codifica para la alanina-tRNA ligasa, *gyrB* que codifica la subunidad β ADN girasa y *era* que codifica una GTPasa. La selección de estos genes se hizo sobre la base de su comportamiento como genes de referencia en anteriores experimentos de RT-qPCR con miembros del mismo género (Nieto *et al.*, 2009). El resto de los genes fueron elegidos como genes hipotéticos de respuesta a bajas temperaturas que, según la literatura (Liljeqvist *et al.*, 2015), se asumió que se sobre-expresaban en estas condiciones: los *primers* para los 4 genes que codifican las vías de síntesis de Trehalosa (*treS*, *glgX*, *treZ*, *treY*); además de *rusA* y *rusB* que codifican variantes para el gen metabólico de la Rusticianina y dos genes que codifican Diguanilato Ciclasas, llamados *dgc-I* y *dgc-II* en este documento. Se usaron los programas informáticos *PrimerPremier* (Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA) para diseñar secuencias de *primers* según los parámetros que eran necesarios teóricamente, el programa Oligoanalyzer (IDT Oligo Analyzer - Integrated DNA Technologies) para analizar las secuencias en función a las estructuras secundarias que se podrían generar, disminuyendo la eficiencia del qPCR y el programa InSilicoPCR que fue usado para determinar la especificidad de los *primers* y el software informático Mfold de la Universidad de Albany para poder conocer la energía libre de los amplicones generados en el RT-qPCR.

Se usó el programa PrimerPremier ingresando los siguientes parámetros:

(Concentraciones de cationes divalentes, monovalentes y dNTPs, hallados a partir de una reacción de qPCR estándar según el reactivo de PCR en tiempo real usado):

-

- Longitud del amplificado: 50 – 180 pb.
- Contenido de GC: 40-60%
- Longitud mínima (pares de bases): 18, longitud máxima:24 (óptimo: 20 nt)
- Temperatura de *melting* (hipotética): min 54°C, max 63°C, best 60°C
- Diferencia máxima de Tm: 10 °C
- max 3' self complementary: 1
- max poly-x: 3
- Energía Libre máxima para *Hairpins* en el extremo 3': -2Kcal/mol
- Energía Libre máxima para *Hairpins* internos: -2 Kcal/mol
- Energía Libre máxima para Homodímeros en el extremo 3': -2 Kcal/mol
- Energía Libre máxima para Homodímeros internos: -5 Kcal/mol
- Energía Libre máxima para Heterodímeros 3': -2 Kcal/mol
- Energía Libre máxima para Heterodímeros internos: -5 Kcal/mol

Los pares de *primers* seleccionados para cada gen fueron sometidos a análisis de estructura secundaria en la página online Oligoanalyzer (URL: <https://www.idtdna.com>), con el objetivo de corroborar que el comportamiento de la estructura secundaria de los oligonucleótidos no pase lo establecido teóricamente.

3. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Se probó la velocidad de crecimiento de la cepa *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 a dos pH diferentes (1.6 – 2.0), en medio líquido 9K (Silverman y Lundgren, 1959) con el objetivo de establecer las mejores condiciones de crecimiento a baja temperatura (5°C) y temperatura ambiente (21 °C). Además, se analizó el crecimiento en medio base 9K suplementado con sulfuro de cobre (CuS) a pH 2.5 y a 5°C. El seguimiento de las cinéticas de crecimiento se realizó con una cámara de conteo Petroff-Hausser (Fisher-

Scientific®) mediante el conteo en triplicado para cada lectura. La cinética de crecimiento fue tomada como referencia para determinar la fase logarítmica en la cual realizar las extracciones de ADN y ARN.

4. AISLAMIENTO DE ADN Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se extrajo ADN a partir de un cultivo en fase logarítmica derivado de una colonia aislada en medio sólido.

Para el protocolo de extracción se centrifugaron 50 mL de medio en tubos Falcon de 50 mL empleando una centrífuga refrigerada a 5°C para obtener la biomasa concentrada en *pellet*, luego se procedió a efectuar lavados con agua destilada pH 2.5 y buffer citrato a pH 7.5 equilibrar el pH de la biomasa de trabajo. El Kit comercial usado para la extracción fue Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Una vez extraído el ADN total, éste fue corrido en una electroforesis en Gel de Agarosa al 1%, observándose la presencia de ADN cromosómico de buena calidad y gran tamaño. La cuantificación del ADN aislado fue realizada por fluorometría con la plataforma Qubit y el nivel de pureza fue establecido por espectrometría con el equipo Nanodrop.

5. DETERMINACIÓN EMPIRICA DE LA TEMPERATURA DE ANNEALING DE LOS PRIMERS

Se utilizó una dilución de ADN estándar de 0.005 ng/μL para cada una de las reacciones en la gradiente de temperatura, se utilizaron 6 puntos de temperatura en un rango entre 52°C a 62°C (52°C; 54°C; 56°C; 58°C; 60°C y 62°C), cada reacción (uno por temperatura) estaba compuesta por los siguientes reactivos en los siguientes volúmenes (ver Tabla 2):

Tabla 2. Reactivos y concentraciones usados para PCR tipo Veriflex™

Reactivo	Conc. Inicial	Volumen (μL)	Conc. Final
Master Mix	2X	10	X
Primer Forward	10 μM	0.4	200 nM
Primer Reverse	10 μM	0.4	200 nM
DNA	0.005 ng	2	0.01 ng
H ₂ O (molecular)	--	7.2	--

Tabla 3. Programa de amplificación PCR Veriflex™ utilizado

	Denaturación Inicial	Denaturación	Hibridación	Polimerización
#ciclos	1	40	40	40
Temperatura (°C)	95	95	Gradiente (52°C-62°C)	72
Tiempo	10 min.	30 seg	20 seg	30 seg

Se utilizó el programa avanzado de PCR en gradiente de temperatura Veriflex™ del termociclador en tiempo real StepOnePlus™. El programa de amplificación se detalla en la Tabla 3.

6. CURVA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA DEL PCR EN TIEMPO REAL

La eficiencia de reacción de cada par de *primers* (*forward* y *reverse*) sintetizados para cada gen seleccionado se validó utilizando el procedimiento de la curva estándar: 5 ng de ADN genómico se diluyeron 1:10 con agua libre de nucleasa de grado molecular en manera seriada, desde los 5 ng/μL hasta los 0,0005 ng/μL de ADN genómico. Las diluciones seriadas se realizaron a partir de volúmenes de 20 μL de la dilución anterior y 180 μL de H₂O de grado molecular libre de nucleasas, según las recomendaciones de Svec et al., (2015).

Cada reacción de PCR de 20 μL contenía 2 μL de las diluciones seriadas entre 5 ng/μL y 0,0005 ng/μL de ADN genómico, 200 nM de cada *primer* y 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix. El colorante de normalización ROX estuvo incluido en el reactivo del Master Mix. El protocolo de ciclado se diseñó teniendo una primera etapa de desnaturalización durante 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a diferentes temperaturas de hibridación según el par de cebadores y 30 segundos a 72°C, la medición de la fluorescencia se realizó en cada ciclo, en los 20 segundos finales de la etapa de extensión a 72°C (ver Tabla 3). El análisis de la *curva de melting* se realizó después de la PCR, el intervalo de temperaturas fue tan bajo como 55°C y aumentó a 0,5°C cada minuto con una medición de fluorescencia continua hasta 95°C. Se observaron picos únicos en cada amplificación (ver Tabla 4). Las reacciones se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados con el software StepOnePlus.

Se usaron 3 repeticiones por punto de la curva estándar según lo recomendado por Svec et al. (2015), para minimizar la variación estándar entre repeticiones.

Tabla 4. Reactivos y concentraciones usados en el PCR de curva estándar

Reactivo	Conc. Inicial	Volumen uL	Conc. Final
Master Mix	2 x	10 uL	x
Primer Forward	10 uM	0.4 uL	200 nM
Primer Reverse	10 uM	0.4 uL	200 nM
DNA	5 - 0.005 ng/uL	2 uL	10ng - 1pg
H ₂ O (molecular)	--	7.2 uL	--

Tabla 5. Programa de amplificación del PCR en tiempo real para la curva estándar

	Denaturación Inicial	Denaturación	Hibridación	Polimerización
#ciclos	1	40	40	40
Temperatura °C	95	95	Ta óptima según el primer	72
Tiempo	10 min.	30 seg	20 seg	30 seg

7. EXTRACCIÓN DE ARN

La biomasa bacteriana requerida para extraer ARN total, en la concentración y calidad requeridas para los procedimientos posteriores, fue de 1×10^9 células, con un tiempo de crecimiento estandarizado de 200-220 horas a condiciones de crecimiento de 5°C y de 20 horas a condiciones de crecimiento de 21°C para llegar a la fase logarítmica media del cultivo, óptima para investigar la expresión genética diferencial. Para cada condición experimental se extrajo ARN total de tres repeticiones biológicas independientes de *A. ferrivorans* PQ33. Las células se concentraron a 5°C y 7680 g durante 15 minutos para

la condición de baja temperatura y a 21°C y 7680g durante 15 minutos para la condición de control (21°C). Todos los materiales de vidrio fueron tratados para eliminar RNAsas (horno de calor seco a 200°C por 8 horas) y se usaron materiales de plástico libres de nucleasas. El agua bidestilada que se usó para preparar las soluciones acuosas fue tratada con dietil-pirocarbamato (DEPC) al 0.1% durante 24 horas a 37°C y posteriormente autoclavada a 121°C y 15 atmósferas por 15 minutos para eliminar los rastros de DEPC.

El protocolo empleado es una variación del protocolo de Lemifil *et al.*, (2009) y de Chen *et al.*, (2012), añadiéndole como pasos adicionales, el método de lavado celular, el buffer de lisis, un paso de protección de RNA con el reactivo RNA protect de Qiagen y el tratamiento múltiple de digestión con DNAsas (1 tratamiento en columna, 2 en el preparado final).

El protocolo fue el siguiente:

- 1.- Centrifugar bacterias de ambas condiciones a 7860 g por 10 min, la temperatura depende de la condición de crecimiento.
- 2.- Lavar con agua ácida tratada con DEPC pH 1.8 acidificada con 10 mM de ácido sulfúrico.
- 3.- Centrifugar 7860 g por 5 min, la temperatura depende de la condición de crecimiento. Decantar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender el pellet celular en buffer TE 400 µL en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
- 5.- Transferir la suspensión bacteriana a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL conteniendo 800 µL del reactivo RNA Protect, inmediatamente vortexear por 5 segundos.
- 6.- Dejar incubando por 5 minutos entre 15-25 °C
- 7.- Centrifugar a 5000 g por 10 min.
- 8.- Decantar el sobrenadante, verter el máximo de sobrenadante vertiendo el tubo sobre un papel absorbente.

9.- Agregar al *pellet* (posiblemente incoloro) 100 uL de buffer TE pH 8 y 10 uL de *buffer* de Lisis (Tris-HCl 0,5 M, EDTA 20 mM, SDS 10%, pH 6,8)

10.- Incubar a 100°C por 3 minutos.

Dejar enfriar hasta llegar a temperatura ambiente

11.- Añadir 700 µL de buffer RLT suplementado con 7 µL de β-mercaptoetanol. Vortexear vigorosamente.

12.- Añadir 500 µL de etanol absoluto, mezclar por pipeteo hasta la homogenización del contenido y transferir 700 µL de la solución conteniendo el lisado bacteriano a una columna de RNeasy mini spin colocada en un tubo de colección de 2 mL, cerrar la tapa cuidadosamente centrifugar por 15 segundos una fuerza mayor de 10 000 rpm, descartar el sobrenadante y volver a cargar a la columna más solución de lisado bacteriano, volver a centrifugar. Descartar sucesivamente el sobrenadante.

Digestión de ADN genómico:

13.- Añadir 350 µL de buffer RW1 a la columna y centrifugar por 15 segundos a más de 10000 rpm, descartar el eluído.

14.- Añadir 10 µL de DNAsa Qiagen a 70 µL de buffer RDD, mezclar por inversión, centrifugar brevemente para coleccionar líquido residual. Añadir los 80 µL de la mezcla directamente a la columna, incubar a temperatura ambiente por 15 min.

15.- Añadir 350 µL de buffer RW1 a la columna, esperar 5 minutos y luego centrifugar por 15 segundos a más de 10000 rpm, descartar el sobrenadante y el tubo de colección.

16.- Colocar la columna en un nuevo tubo de colección, Añadir 500 µL de buffer RPE, centrifugar por 15 seg a más de 10000 rpm, descartar el eluido.

17.- Añadir 500 µL de buffer RPE a la columna, cerrar la tapa y centrifugar 2 minutos a más 10000 rpm para lavar toda la columna y membrana, si se desea centrifugar 1 minuto más en otro tubo de colección.

18.- Añadir 40 uL de agua libre de RNAsa a la columna, cerrar la tapa y centrifugar por 1 min a más de 10000 rpm para eluir el RNA.

Posterior a la extracción, la pureza se midió utilizando un equipo nanodrop, el ratio 260/280 se mantuvo entre 1.8-2, la integridad se evaluó usando electroforesis en gel de agarosa suplementado con lejía comercial a una proporción de 500 μ L de Lejía comercial (Hipoclorito de sodio 5%) por cada 50 mL de solución de Buffer TAE y 1% de agarosa (Aranda *et al.*, 2012). La concentración fue medida con fluorometría Qubit. El ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

8. RETROTRANSCRIPCIÓN

Para la retrotranscripción, se utilizó como molde una cantidad estandarizada de 1ng/ μ L de ARN total por reacción, por cada réplica biológica de cada condición se hicieron dos reacciones: una reacción con todos los componentes del kit de retrotranscripción y una reacción similar pero sin retrotranscriptasa que servirá como control negativo de la presencia de ADN genómico en la preparación; se prosiguió con los protocolos establecidos de acuerdo con el Kit de ADNc de First Strand de Thermo Scientific, el ADNc se almacenó a -80°C y se diluyó 1:10 antes de su uso.

9. PCR EN TIEMPO REAL

El conjunto de cebadores para el PCR en tiempo real, las eficiencias de amplificación (E) y la temperatura de hibridación empírica se muestran en la Tabla 1. Los experimentos de PCR en tiempo real de cuantificación relativa se llevaron a cabo en la plataforma StepOne Plus 7500 usando como reactivo de amplificación al Power SYBR® Green PCR Master Mix de Thermo Scientific. Cada 20 μ L de reacción de PCR contenía 2 μ L de cDNA diluido 1: 100; 200 nM de cada cebador y 1X Power SYBR® Green PCR Master Mix. El colorante ROX de referencia se incluyó en la mezcla maestra. El protocolo de ciclo se diseñó teniendo una primera etapa de desnaturalización durante 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a diferentes temperaturas de hibridación según el par de cebadores y 30 segundos a 72°C, medido después de la fase de extensión a 72°C. El análisis de la curva de fusión se realizó

después de la PCR, el intervalo de temperaturas fue tan bajo como 55°C y aumentó a 0,5°C cada minuto con una medición de fluorescencia continua hasta 95°C. Se observaron picos únicos en cada amplificación. El mismo lote de ADNc se utilizó para la evaluación de la expresión de todos los genes en este estudio. Las reacciones para gen en estudio y gen de referencia se realizaron por triplicado y en el mismo experimento de PCR. Se realizaron reacciones para controles negativos, una vez por gen y controles de retrotranscriptasa para cada muestra por gen.

10. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE RT-QPCR

La validación de los genes de referencia se realizó con la hoja de algoritmo GeNorm en Microsoft Excel y el algoritmo NormFinder, también disponible como un enchufe de Excel. El análisis bioinformático de los resultados relativos RT-qPCR se llevó a cabo con el programa REST2009, 10000 iteraciones de los datos fue utilizado como método de validación estadística.

V. RESULTADOS

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico extraído tuvo una pureza aceptable en el equipo Nanodrop® dando una relación 260nm/280nm de 1.75 así como de buena integridad según la electroforesis convencional en gel de agarosa (carril número 1, Figura 10). La concentración fue de 40 ng/μL, suficientes para proseguir con los procedimientos moleculares requeridos.

BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS Y DISEÑO DE PRIMERS

Los ORFs (*Open Reading Frames*, secuencia dentro del gen que codifica totalmente a la proteína) se obtuvieron a partir del genoma anotado de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 depositado en GenBank.

A pesar del estatus de algunas de estas anotaciones como putativas, hipotéticas o pseudo anotaciones, se logró comprobar que todos los ORFs pertenecían a genes transcripcionalmente activos, delimitados en la Tabla 6, los genes que pertenecen al operón de la trehalosa se pudieron encontrar de forma contigua en el mismo *contig*, como teóricamente han sido descritos. Se usaron los programas informáticos anteriormente mencionados para medir los parámetros de búsqueda de *primers* (ver Figuras 6 a 9).

Tabla 6. Genes analizados en esta investigación, cuyas secuencias fueron extraídas del genoma anotado de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33, se indica las localizaciones en el genoma, tanto el *contig*, como la posición de la secuencia (número de pares de base) dentro de determinado *contig*.

Gen de Interés	<i>Contig</i>	Posición en el <i>contig</i> (pares de base)
<i>rpoC</i>	1	49112 - 44949
<i>gyrB</i>	12	84543 - 85142
<i>alaS</i>	25	11268 - 8632
<i>era</i>	36	30255 - 29341
<i>16rRNA</i>	63	23810 - 22287
<i>treS</i>	62	1947 - 5363
<i>glgX</i>	62	5377 - 7509
<i>treZ</i>	62	7506 - 9341
<i>treY</i>	62	9338 - 14476
<i>dgc-I</i>	13	11002 - 12801
<i>dgc-II</i>	21	394 - 2991
<i>rusB</i>	19	736 - 1249
<i>rusA</i>	29	4443 - 4073

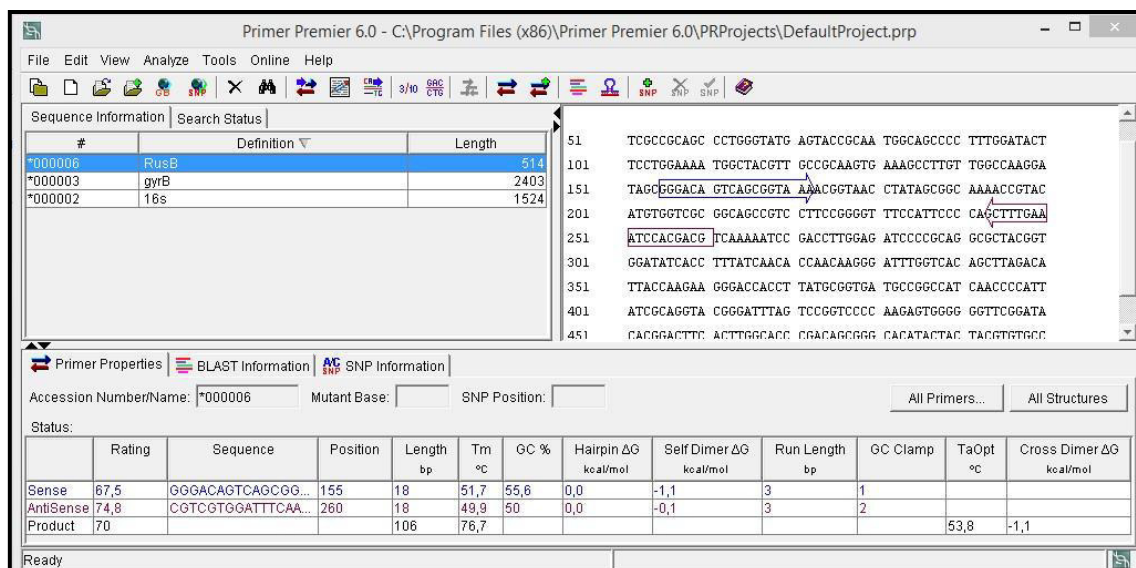


Figura 6. Resultados de búsqueda de *primers* dentro de las secuencias de los genes a analizar, en el cuadro superior derecho se muestra la secuencia completa del gen *rusB*, se observan dos fechas englobando las secuencias del mejor par de *primers* según el programa. En el cuadro superior izquierdo, se observa el estatus de búsqueda, debajo se muestra el mejor par de *primers* encontrados y una descripción de los parámetros importantes para el diseño de *primers*.

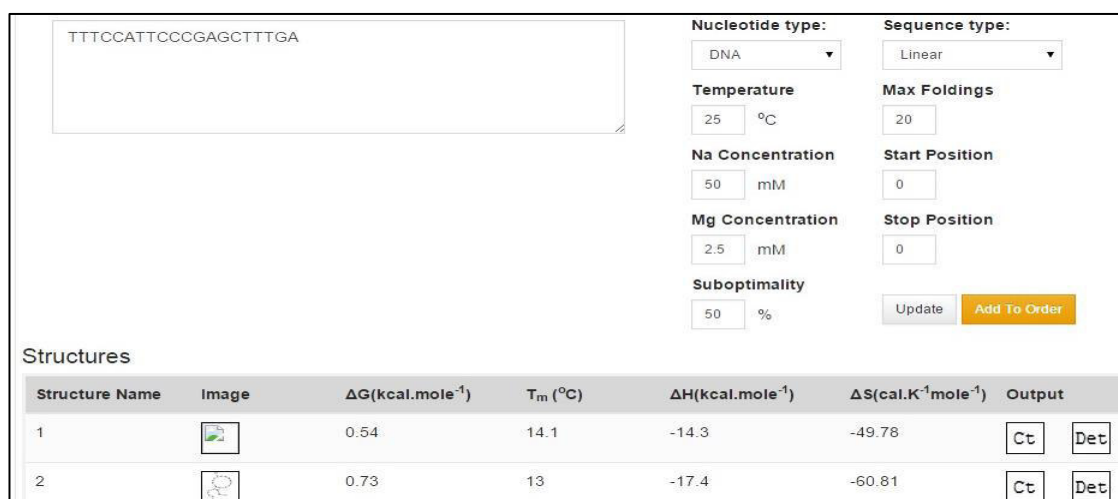


Figura 7. Se aprecian los parámetros de concentración de sales y solutos en la reacción de RT-qPCR así como el resultado del análisis de estructuras secundarias (hairpin) para un *primer* del gen *rusB*, garantizando que se encuentren dentro de los valores establecidos para no interferir con la eficiencia del PCR (Software online Oligoanalyzer).

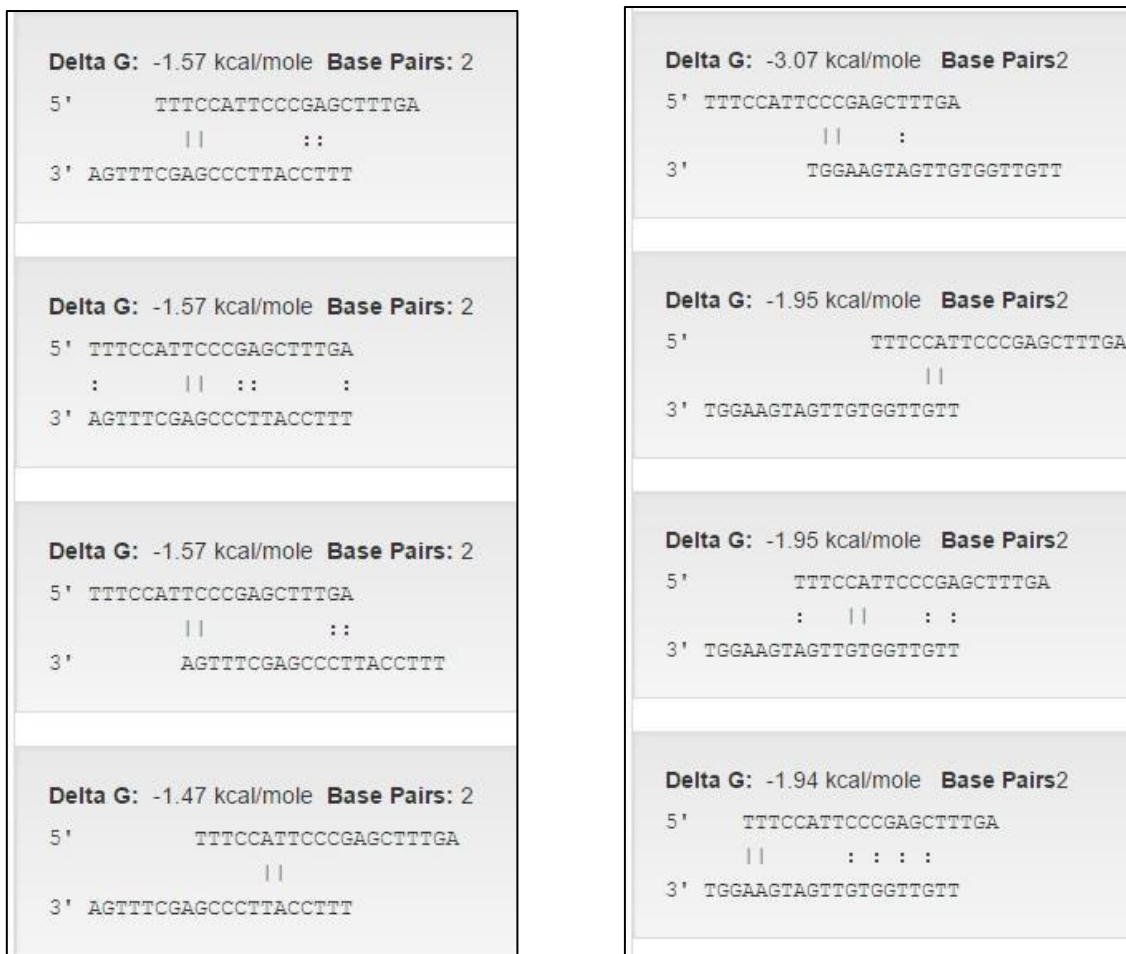


Figura 8. Izquierda: Se observan las simulaciones con el software online OligoAnalyzer de interacción entre dos oligonucleótidos idénticos para un primer del gen *rusB* (homodímeros) observándose una interacción saludable sin formación de extremos 3' estables que podrían permitir la formación de amplificadores inespecíficos.

Derecha: Se observan las interacciones de secuencia entre pares de *primers* de diferente especie (heterodímeros) se puede observar que las interacciones son de poca estabilidad (energía libre de Gibbs <3 Kcal/mol) y no se generan extremos estables proclives a polimerización en el extremo 3'.

Todas las secuencias fueron analizadas en el programa PrimerPremier6 (PREMIER BIOSOFT) para la búsqueda de secuencias de oligonucleótidos adecuados para realizar la actividad de *primer* o cebador.

Mediante el software en línea Mfold de la universidad de Albany se determinó que la capacidad de formación de estructuras secundarias de los amplicones fue mayor a las -10 Kcal/mol de energía libre de Gibbs lo cual coloca a estas secuencias en el rango

apropiado para la correcta amplificación de todas las secuencias de interés, validando los *primers* diseñados.

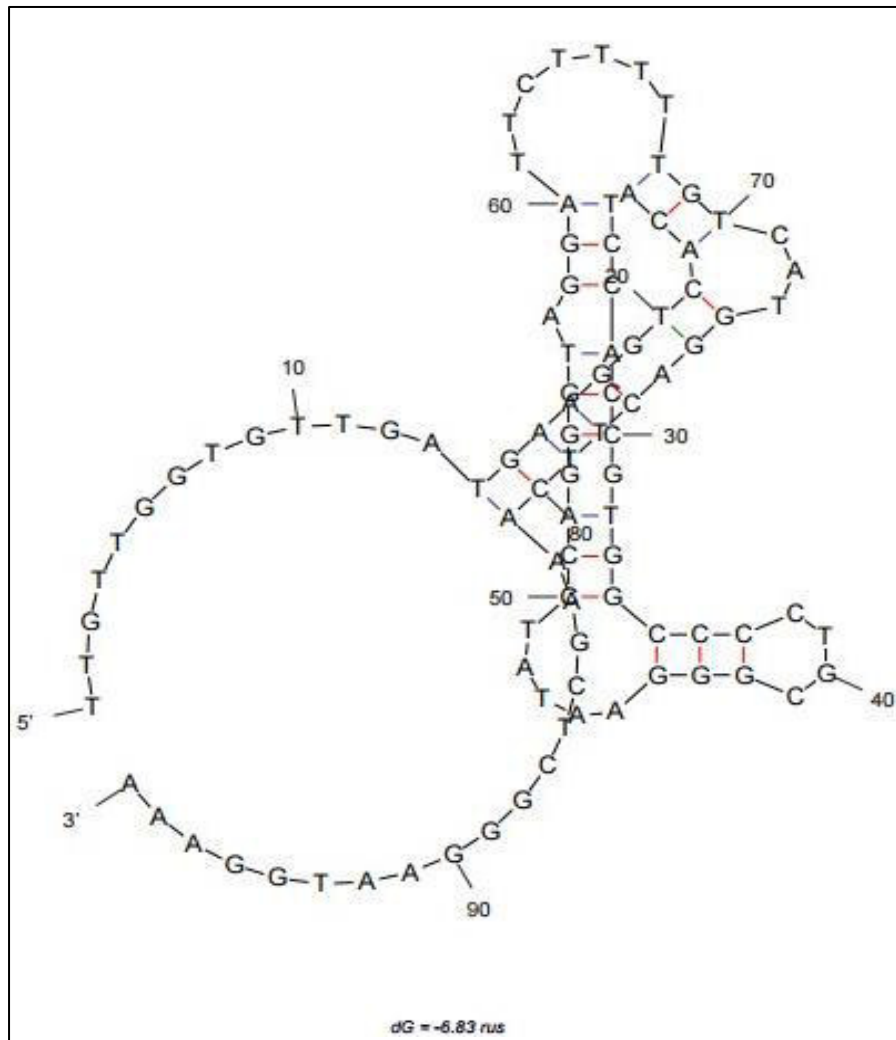


Figura 9. Se puede observar la conformación secundaria del amplicón generado a partir de los *primers* para el gen *rusA* que codifica a la proteína Rusticianina en el programa online mFold. Siendo su energía libre de Gibbs máxima de -6.8 Kcal/mol y no llega a -10 Kcal/mol recomendados como el mínimo aceptable de energía libre.

Luego de analizar las secuencias sugeridas y confrontarlas con los softwares de análisis de estructura secundaria, se obtuvieron los pares de *primers* para los genes de interés que se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de energía libre de Gibbs alcanzados para cada estructura secundaria en cada primer usado en la investigación, se observa que los valores entraron en los límites requeridos para obtener buenos *primers* que permitan una buena eficiencia de reacción, en el caso de los *primers* para dGc4 (guanilato ciclasa homóloga en genoma) y pdGc (guanilato ciclasa plasmídica) no se obtuvieron bioinformáticamente amplicones ya que la síntesis se hizo a partir de *contigs* del genoma de la cepa PQ33

	ACIDITHIOBACILLUS FERRIVORANS				Tamaño
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
rpoC	TTGCCGACCAGTTGATGTA	-3	-1	-11	106
	ACAGACACCATGCCGTGAAC	-3	-2		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
era	TCAGATTCTCGGGATACT	-3	0	-5	83
	GACTGCGATAACCACTATG	-3	-2		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
alaS	CATCTGCCCAAACCTCT	-3	0	-8	90
	GTCGGTGTACATGTTGTTGT	-3	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
treS	CACAATAATCCACAGGTAGTCAAG	-3	0	-2	57
	GTCCAGCCAGTAGCGTAG	-3	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
glgX	CAGCATGGGATGGGAATGG	-5	0	-6	83
	CTTGGCATCGAACAGGCAG	-6	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
TreZ	CGTCTGTTACCAAGTTCCTA	-3	-1	-3	86
	CGGCGTCTGTTACCAAGTTCCTA	5	0.96		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
TreY	CCTCTCGTAAGCAAGGTTGG	-4	0	-6	69
	CTCAAGGCAGTGAAGGAGG	-3	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
rusA	TTTCCATTCCCGAGCTTTGA	-6	-1.5	-6	98
	TTGTTGGTGTGATGAAGGT	-2	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
sqr	GGTGGATGAGAAGGGTGA	-1	0	-2	54
	CCGAACCTGACTGGCAGA	-3.6	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
dGc4	CGCAACATGGATGAAGTAGA	-3	0	sin datos	100 approx
	AGACTCGCTGAATGCTG	-3	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
dGc6	ATCTCTTCTGCCGATTA	-3	-1	-3	71
	CTTGGGATTGGTGCCTTT	-3	0		
	PRIMER PREMIER	Dímeros menor delta G	Dímeros 3' menor delta G	G amplicón	pb
pdGc	ATGGAATCTATGGCGAA	-3	0	sin datos	100 approx
	GTCGTCCAGAGGATAGAG	-3	0		

No se observaron amplificaciones secundarias o dímeros *de primers* cuando se evaluó la especificidad de los *primers*, se observaron bandas únicas en electroforesis de gel de agarosa al 2% (ver Figuras 10, 11 y 12).

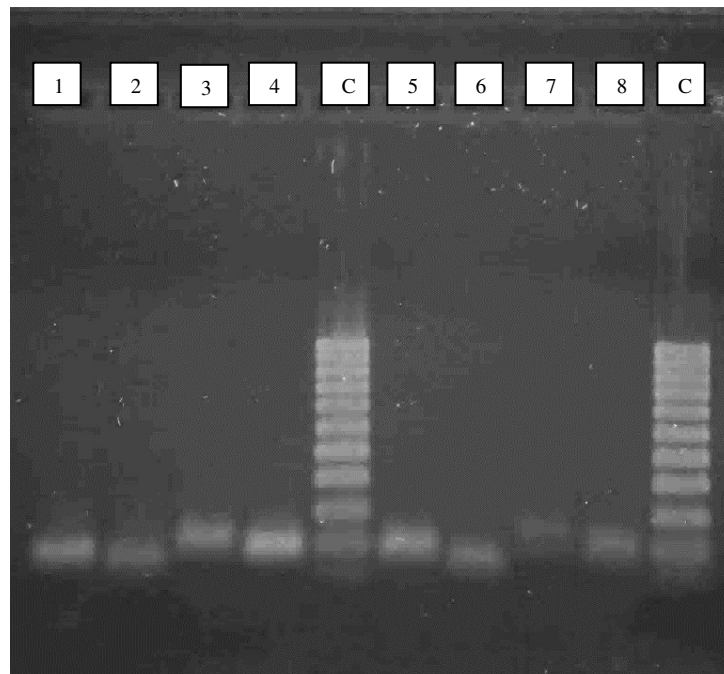


Figura 10. Gel de electroforesis mostrando las bandas de productos de reacción de PCR en Tiempo Real para 8 genes seleccionados, (1: *glgX*; 2: *treY*; 3: *rpoC*; 4: *alaS*; 5: *treZ*; 7: *rusA*; 8: *era*) además de dos carriles mostrando ladder de corrida de 50 pb (50 bp DNA Ladder, Life technologies) comprobándose que no hay presencia de dímeros de primers ni amplificación inespecífica. El carril número 6 pertenece a la amplificación con un par de primers no usado en este estudio para el gen *sqr*.

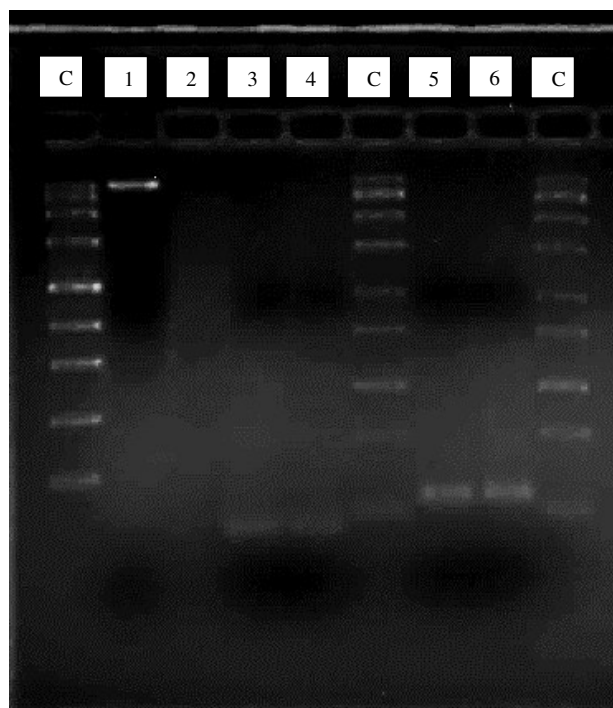


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa mostrando las bandas de productos de reacción de PCR en Tiempo Real para 2 genes seleccionados, 1: DNA genómico total de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33; C: *Leader* de corrida de 50 pb (50 bp DNA *Leader*, life technologies 3 y 4: *16S rna* 5 y 6: *gyrB*; comprobándose que no hay presencia de dímeros de *primers* ni amplificación inespecífica.

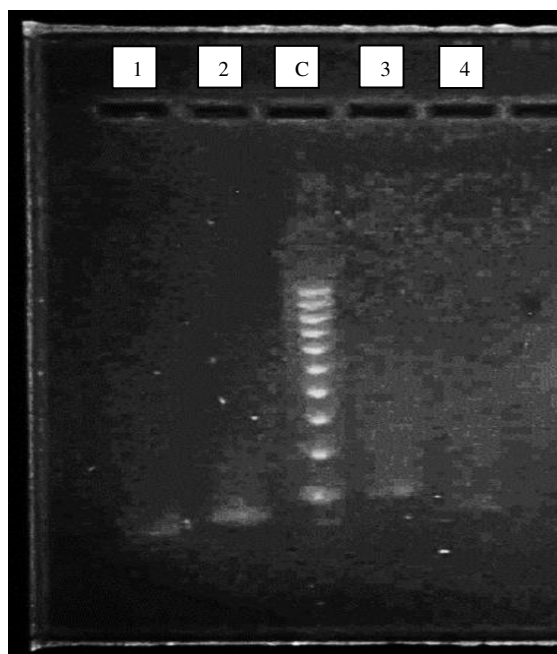


Figura 12. Corrida electroforética producto de PCR en tiempo real de 4 genes, 1: *treS*, 2: *pdgc*: diguanilato ciclasa plasmídica descartada del estudio, 3: *dgc4*, 4: *dgc6*) comprobándose que no hay presencia de dímeros de *primers* ni amplificación inespecífica.

DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO ÓPTIMA

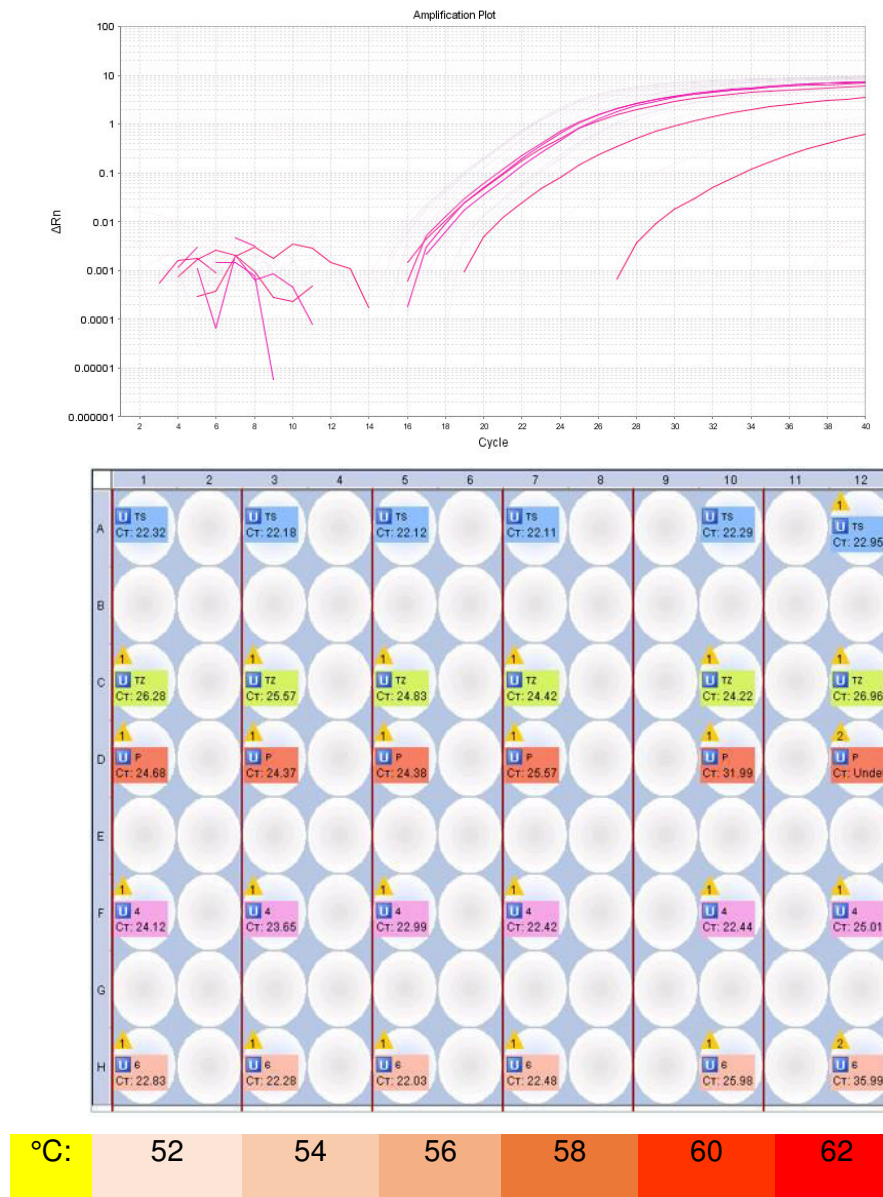


Figura 13. Se observa el experimento de temperatura de alineamiento para los *primers* de los genes *treS*, *treZ*, *dgc6* y *dgc4*. **Arriba**, en el cuadro denominado “Amplification plot” se describe la curva de amplificación del PCR en tiempo real en gradiente de temperatura, la mejor temperatura de *annealing* es aquella que permite la detección de la curva a un C_t más temprano y produce un *plateau* de mayor intensidad. **Abajo**, esquema de resultados en cada pocillo según la placa Veriflex: Se observa la separación por columnas según el rango de temperaturas indicado en la parte inferior.

EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN

A continuación, se muestran las curvas de amplificación (ver **Figuras 14 a 47**), la curva de *melting* y la línea de regresión de la curva estándar que determina la eficiencia de cada reacción de PCR (ver tabla 7)

1. Gen *rpoC*

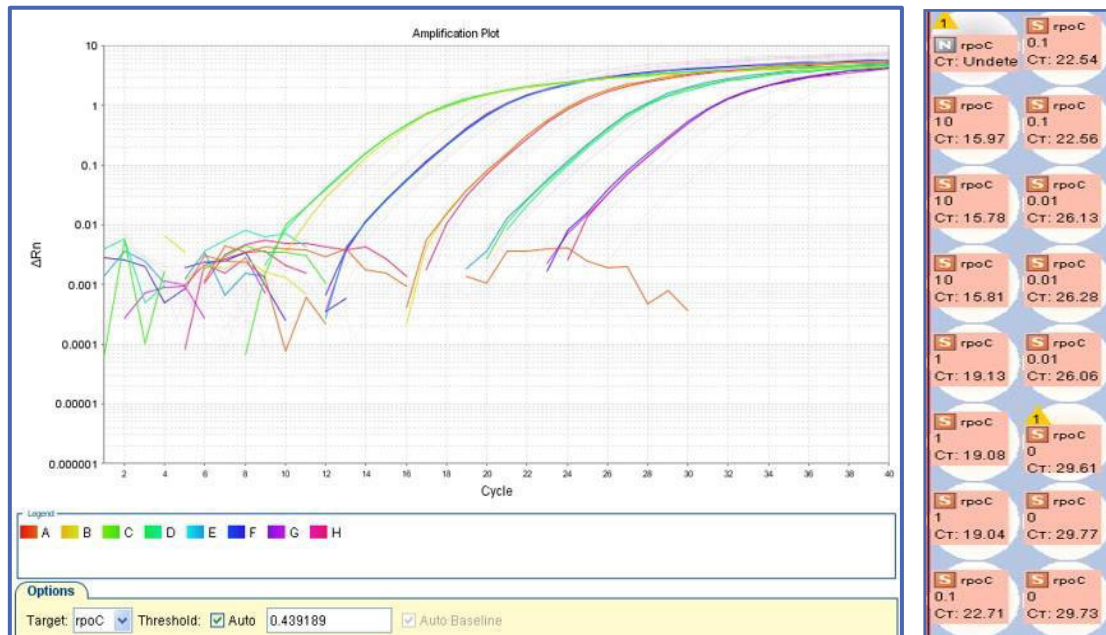


Figura 14. Curva de amplificación para la construcción de la curva estándar del gen *rpoC*.

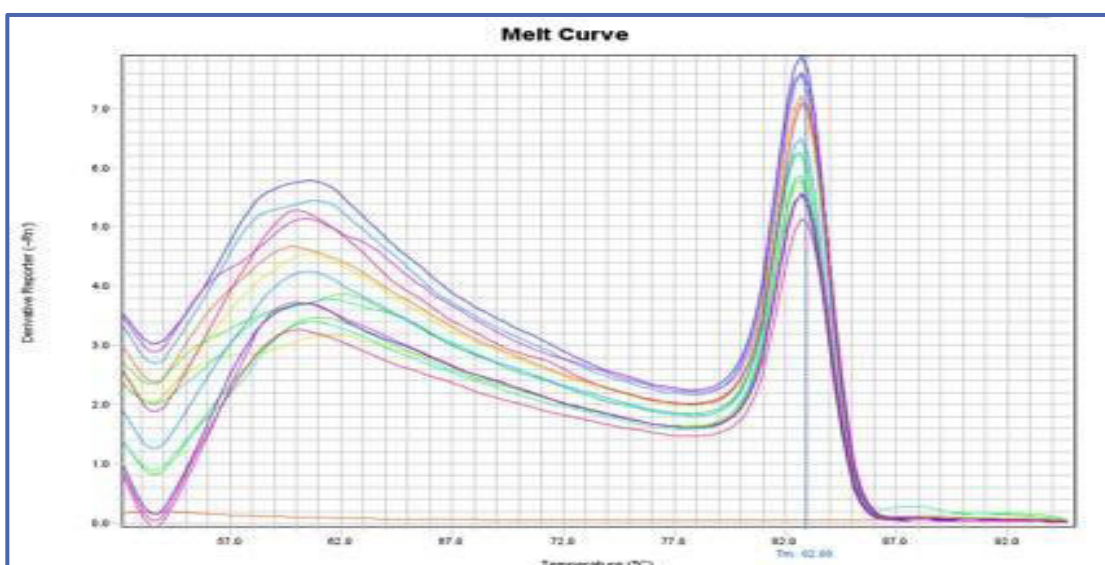


Figura 15. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *rpoC*, se observa un pico secundario y definido entre 77-82°C generado por el amplicón.

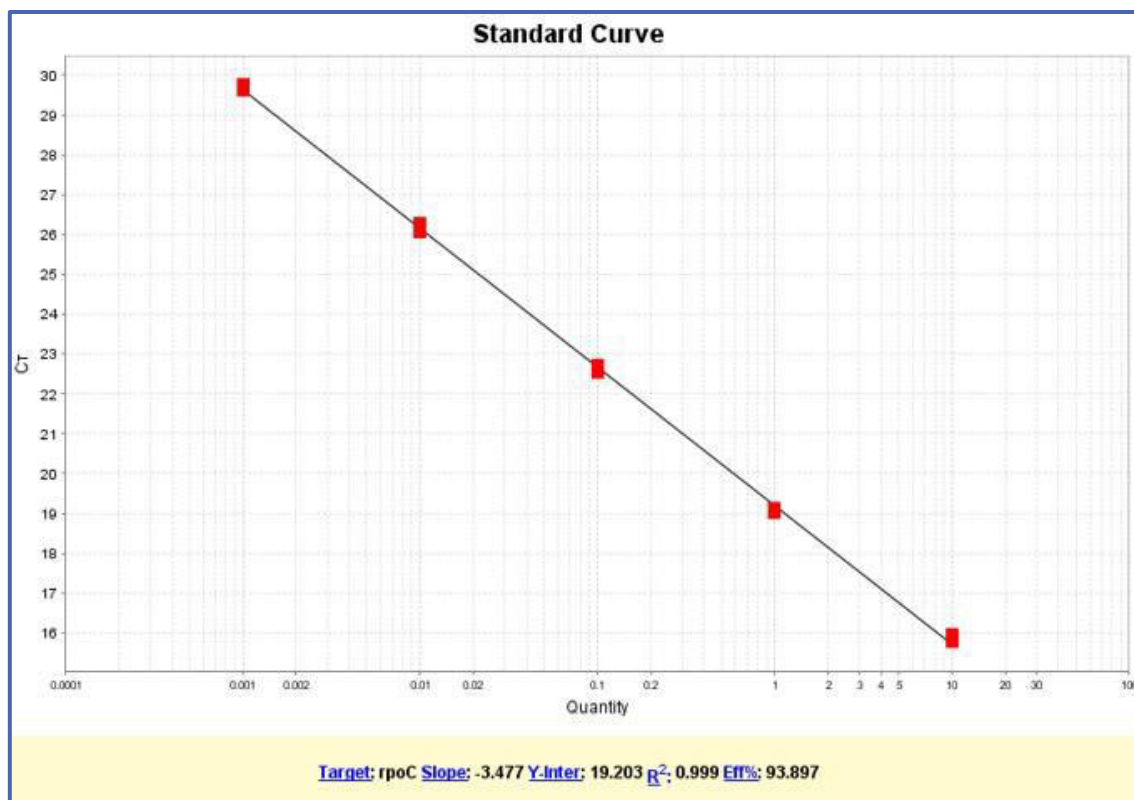


Figura 16. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real para el gen *rpoC*.

2. Gen 16 srRNA

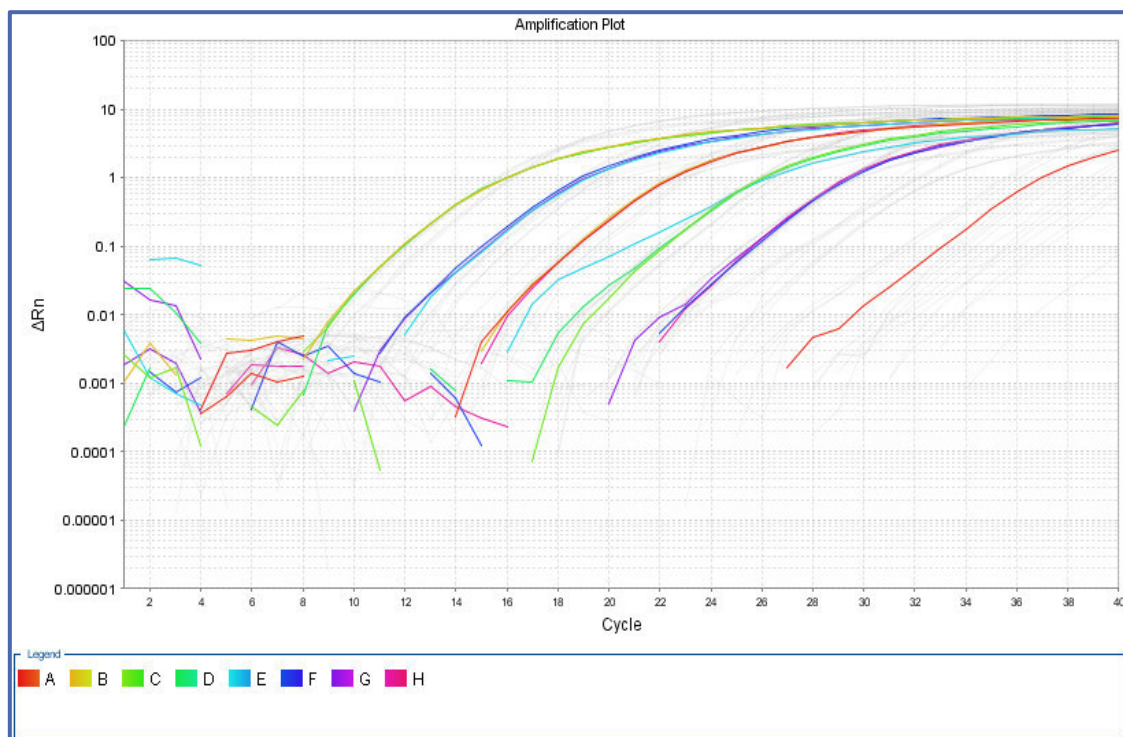


Figura 17. Curva de amplificación del ensayo de eficiencia del gen *16S rRNA*.

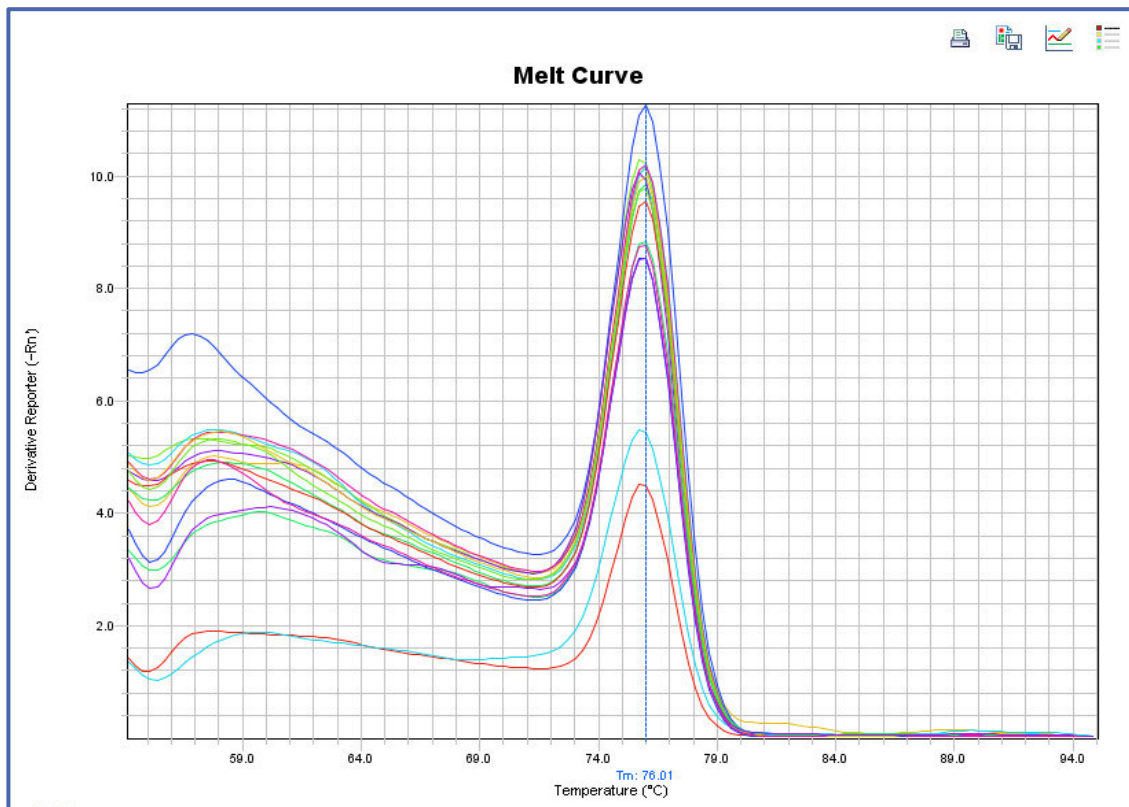


Figura 18. Curva de “melting”, para el amplicón de los *primers* para *16S rRNA*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 74-79 °C generado por el amplicón.

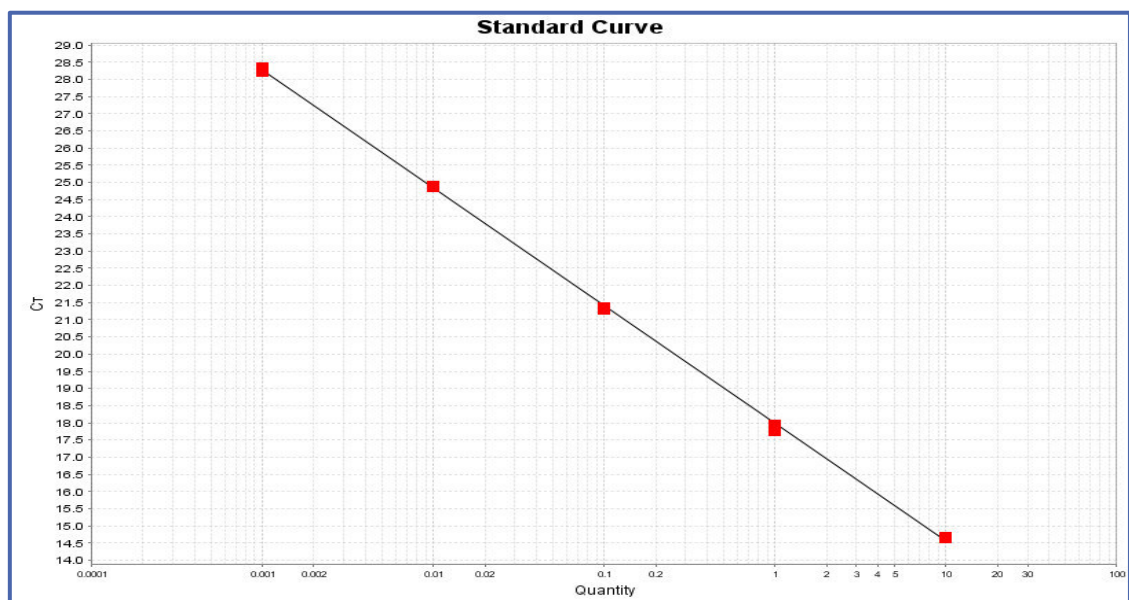


Figura 19. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real del gen *16S rRNA*.

3. Gen *gyrB*

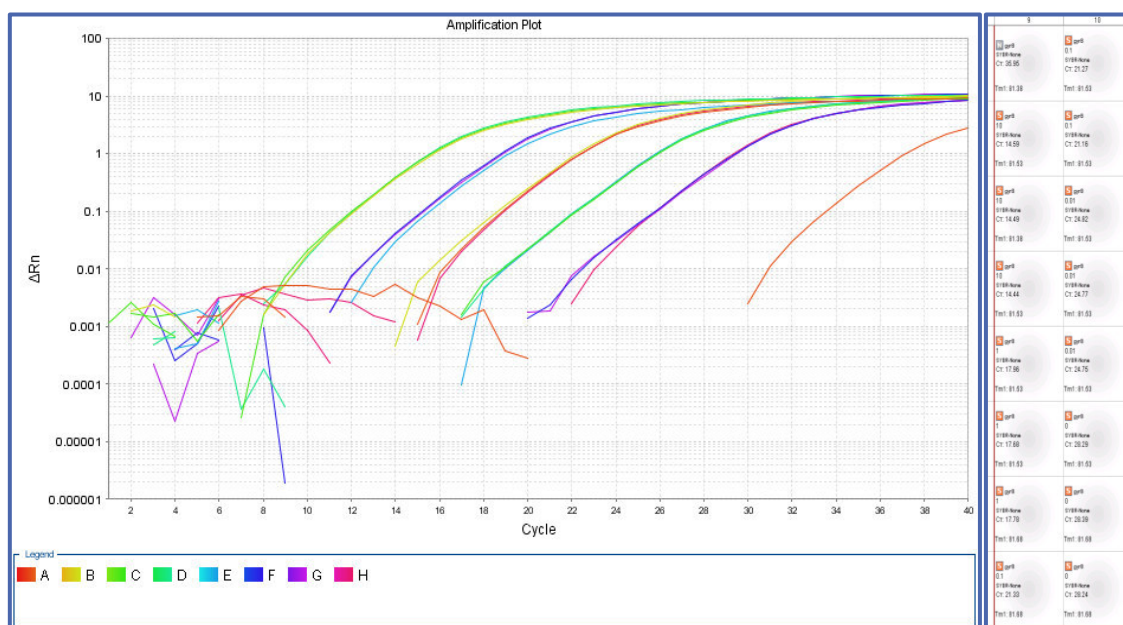


Figura 20. Curva de amplificación del ensayo de eficiencia del gen *gyrB*.

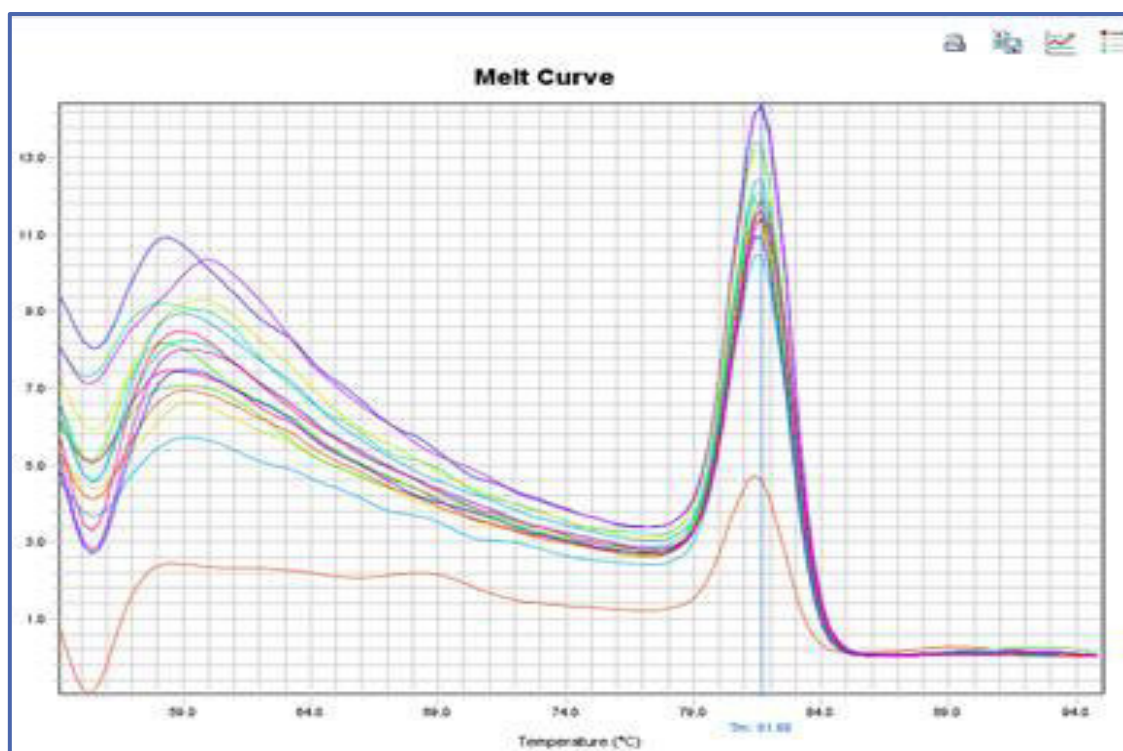


Figura 21. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *gyrB*. Se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 79-84°C generado por el amplicón.

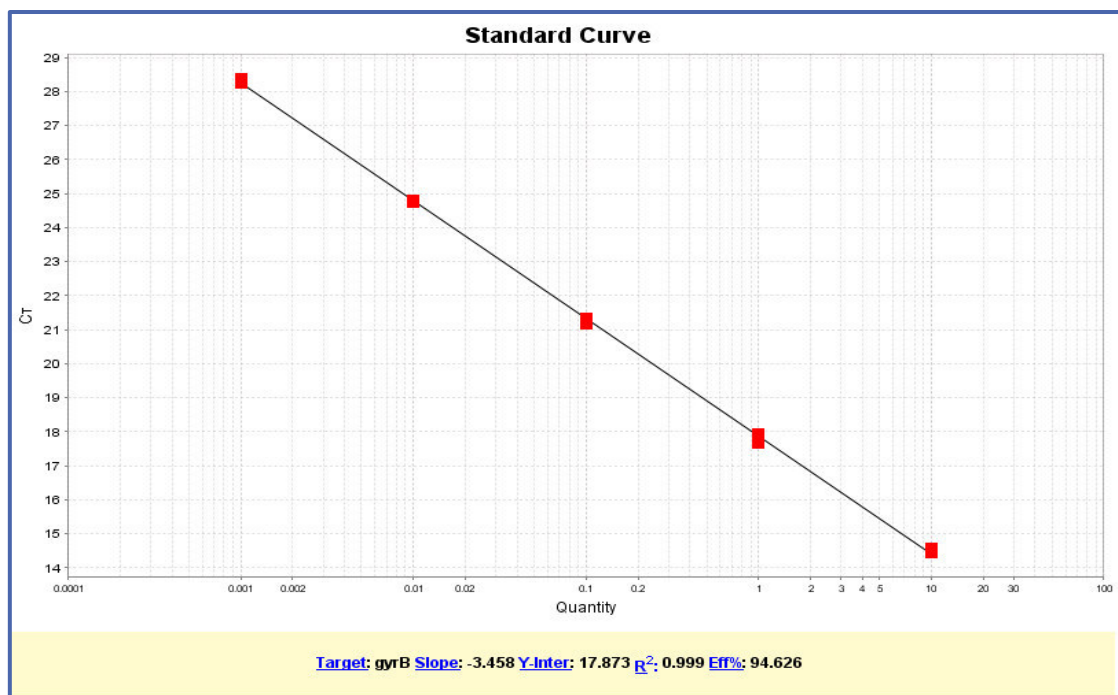


Figura 22. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real del gen *16S rRNA*.

4. Gen era

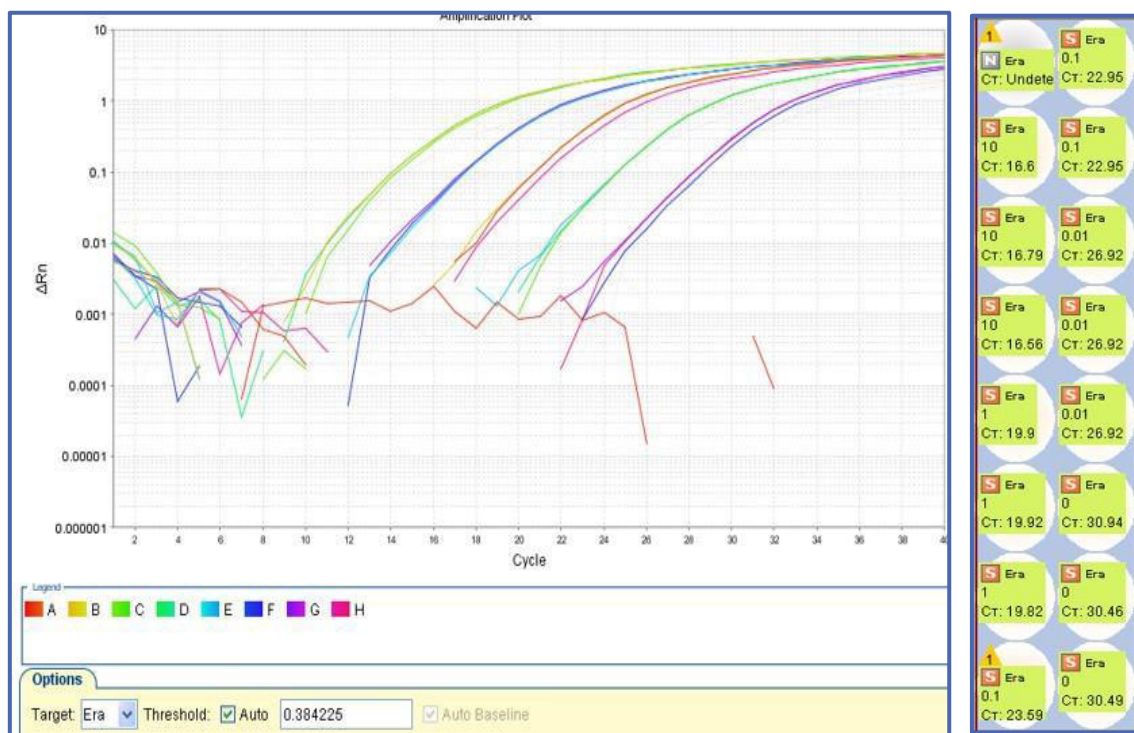


Figura 23. Curva de amplificación del ensayo de eficiencia del gen *era*.

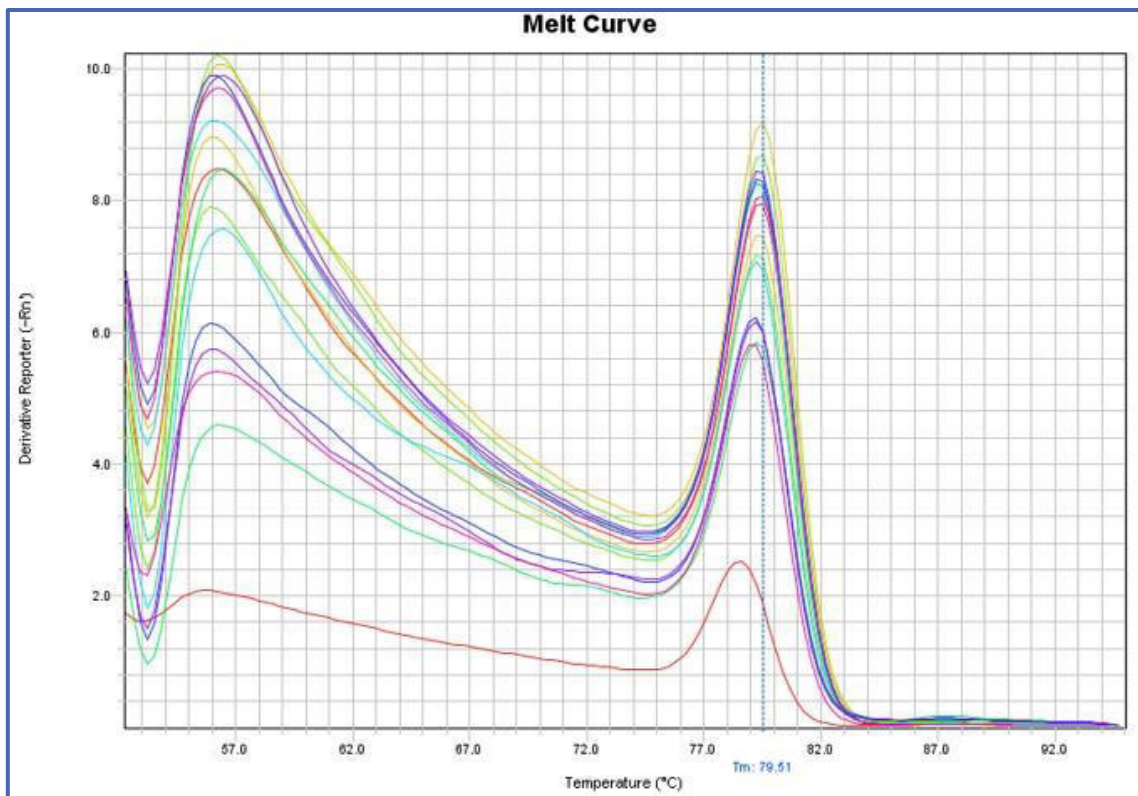


Figura 24. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *era*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82°C generado por el amplicón.

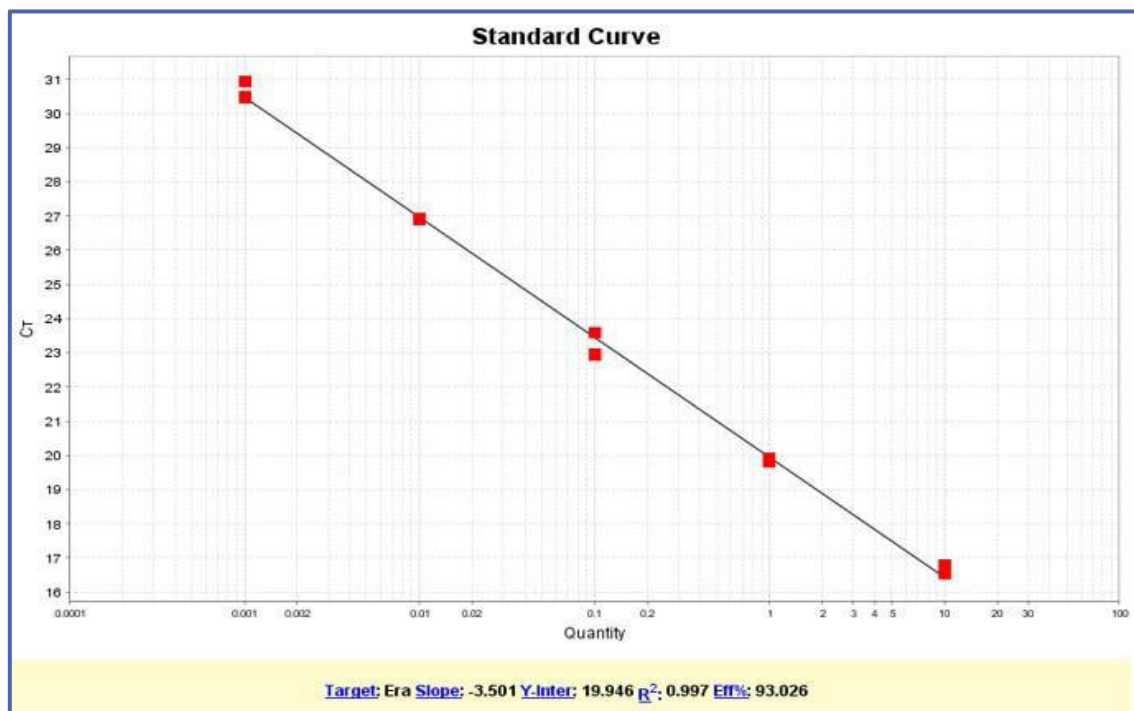


Figura 25. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real.

5. Gen *alaS*

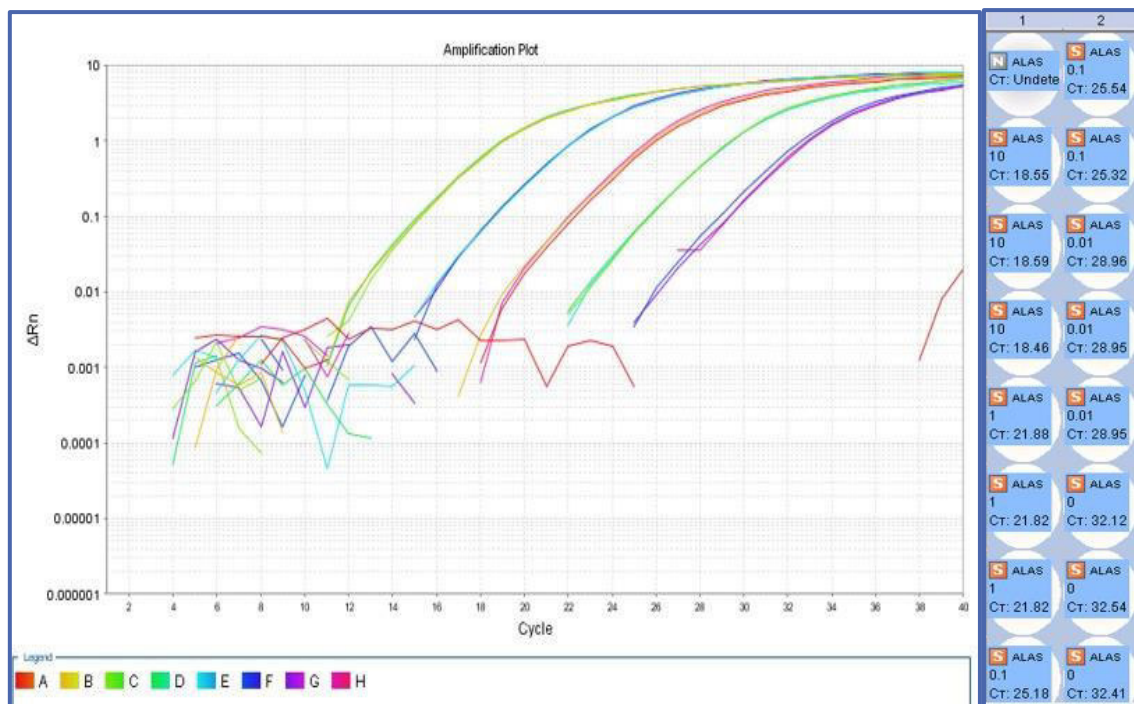


Figura 26. Curva de amplificación del ensayo de eficiencia del gen *alaS*.

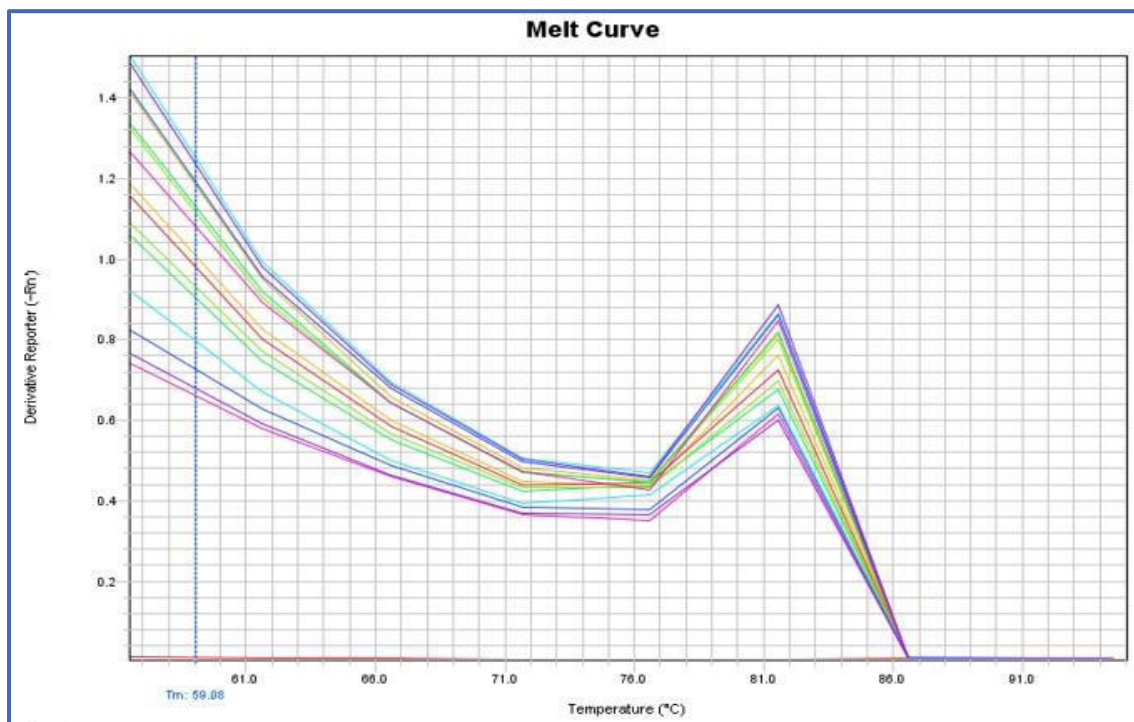


Figura 27. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *alaS*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82° C generado por el amplicón.

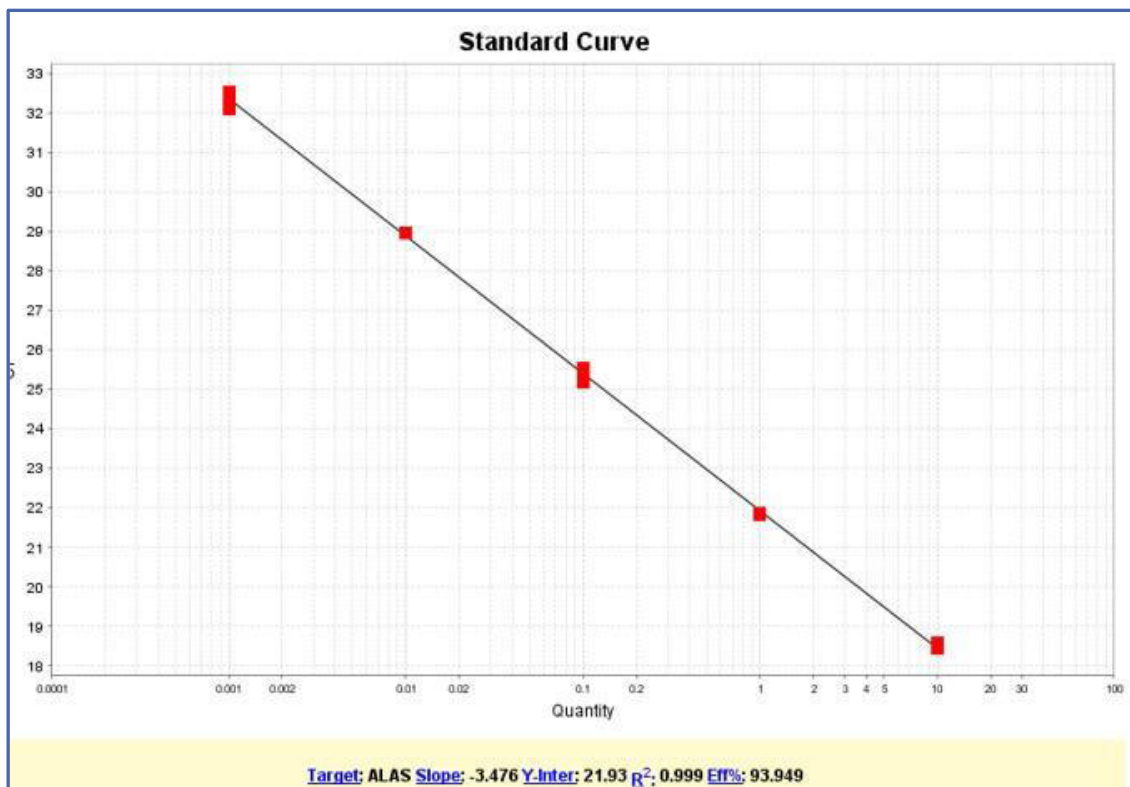


Figura 28. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real

6. Gen *rusA*



Figura 29. Curva de amplificación del ensayo de eficiencia del gen *rusA*.

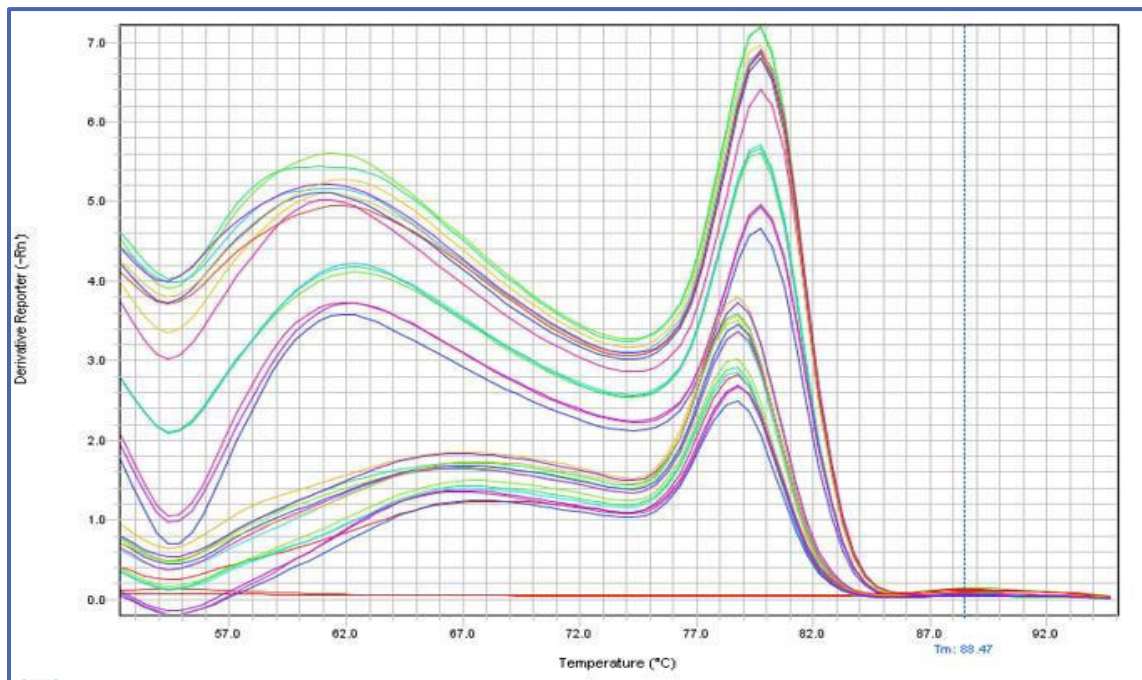


Figura 30. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *rusA*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82 °C generado por el amplicón.

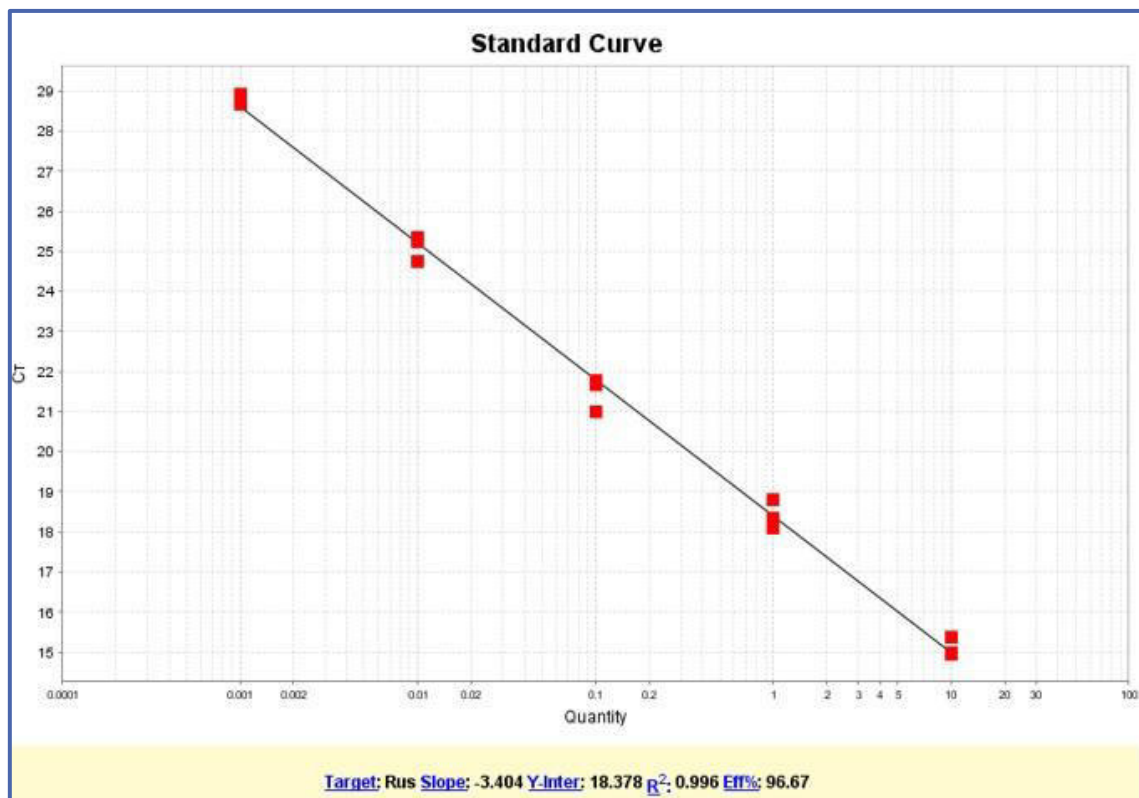


Figura 31. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real.

7. Gen *dgc-I*

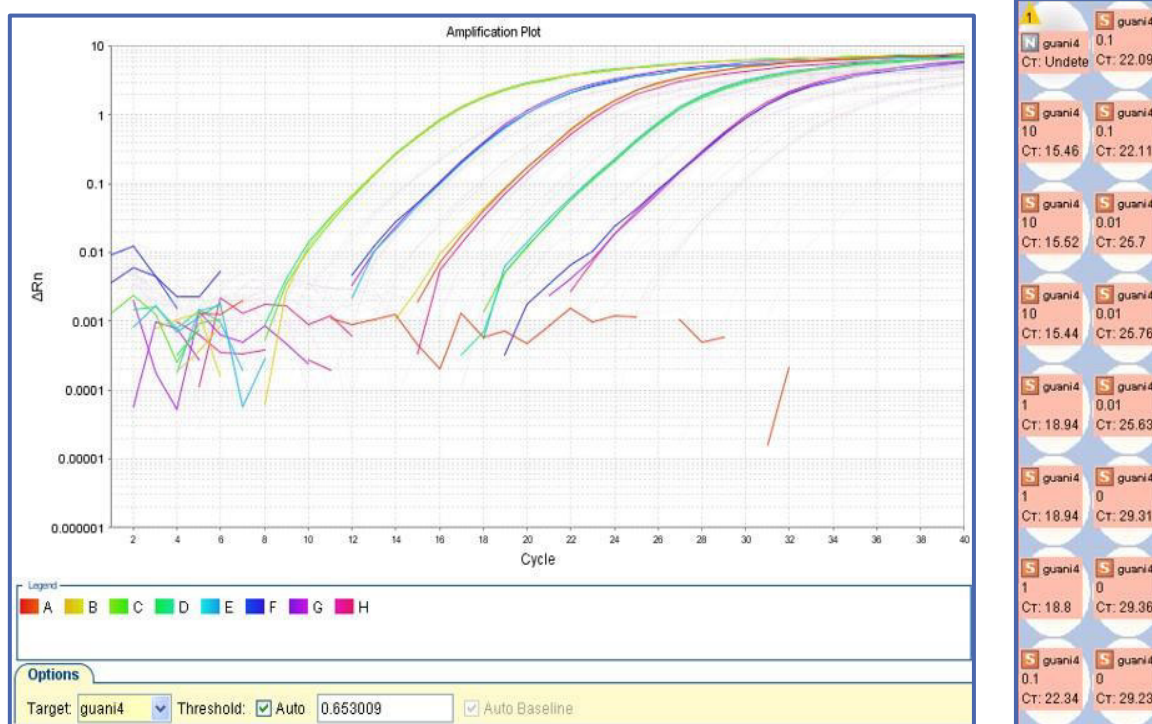


Figura 32.- Curva de amplificación del ensayo de eficiencia del gen *dgc-I*.

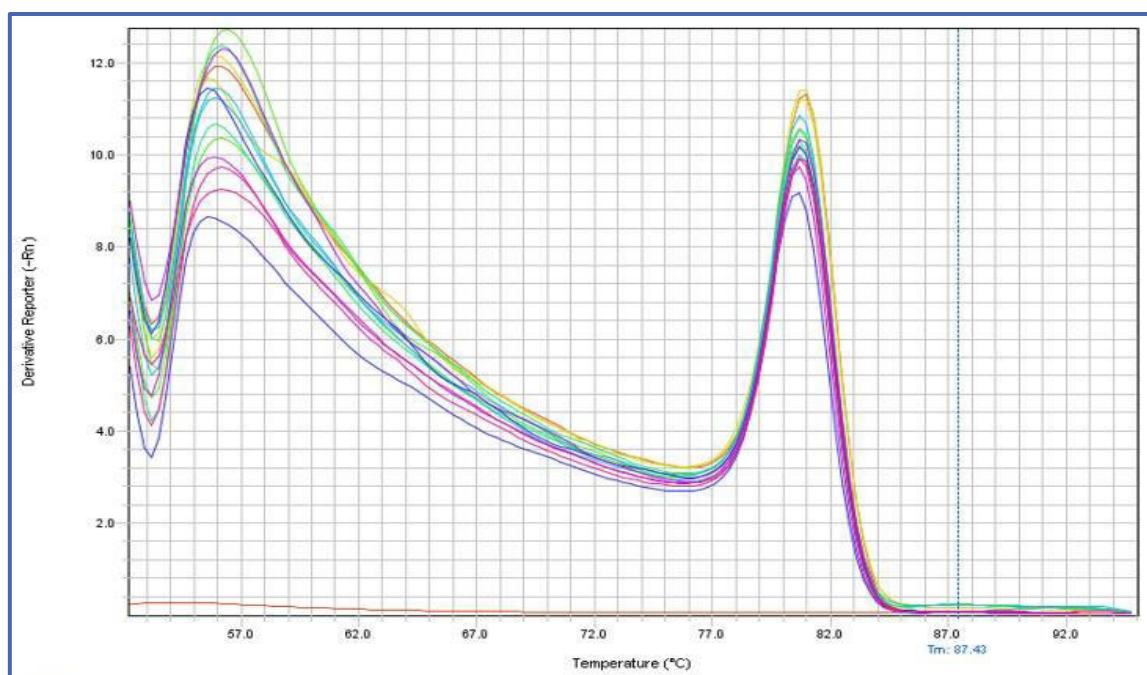


Figura 33. Curva de *melting* para el gen *dgc-I*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82° C generado por el amplicón.

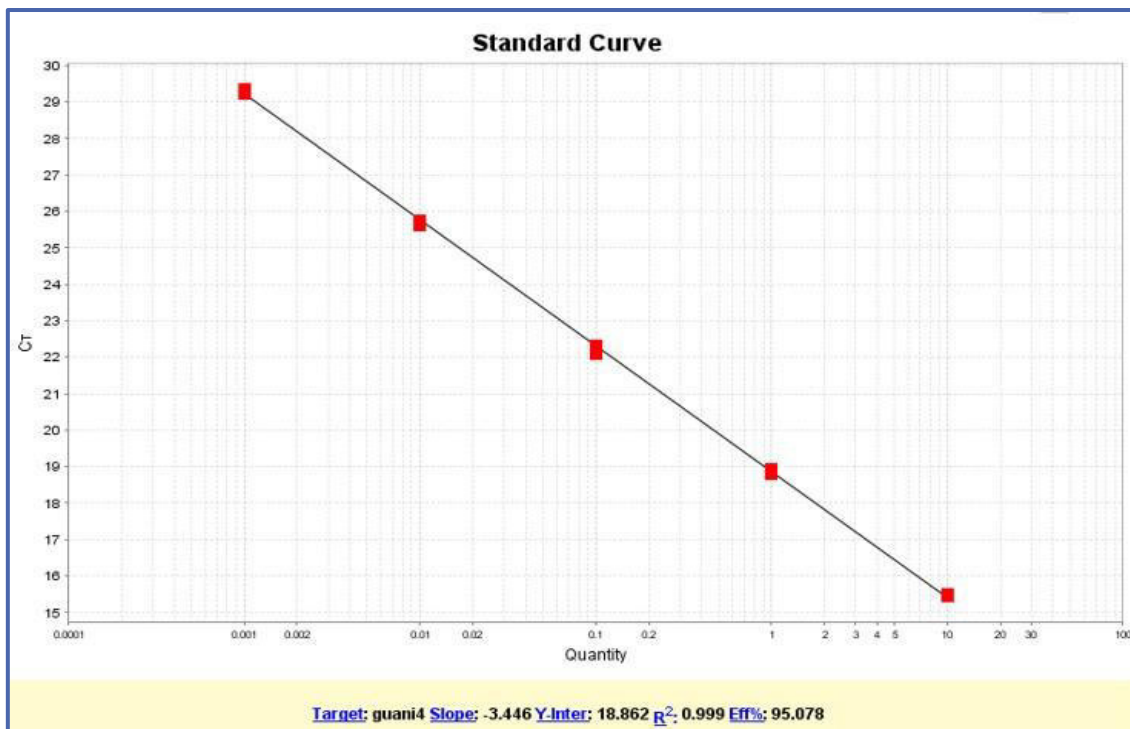


Figura 34. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real del gen *dgc4*.

8. Gen *dgc-II*

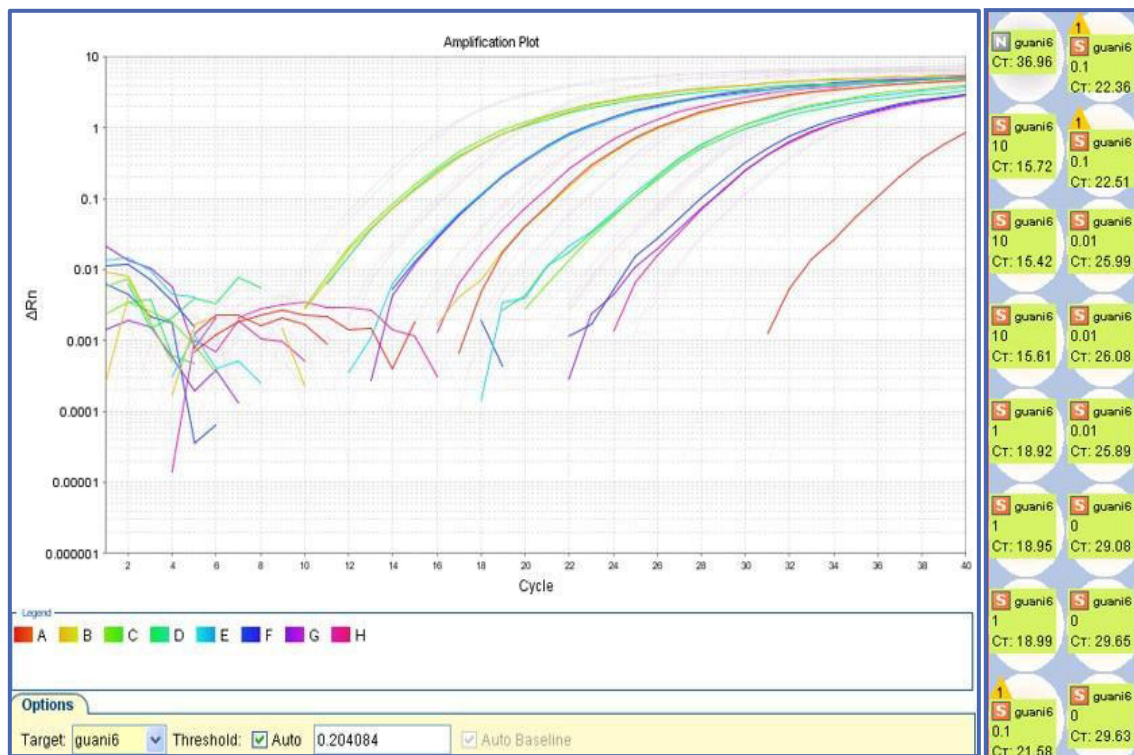


Figura 35. Curva de amplificación del ensayo de eficiencia del gen *dgc-II*.

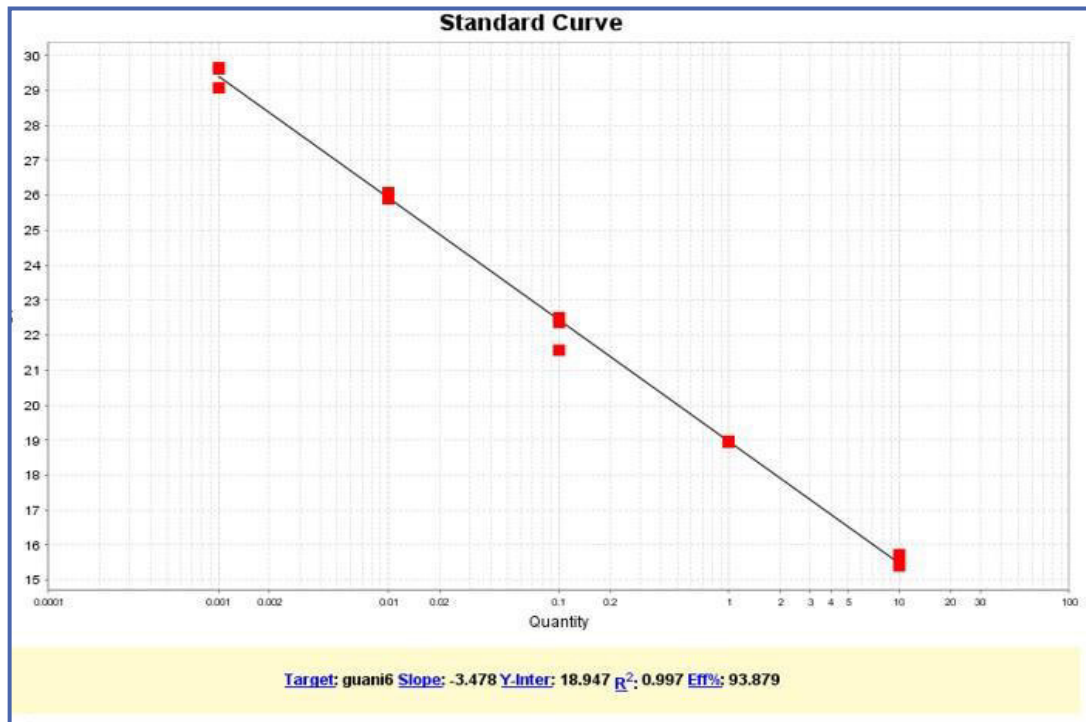


Figura 36. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real

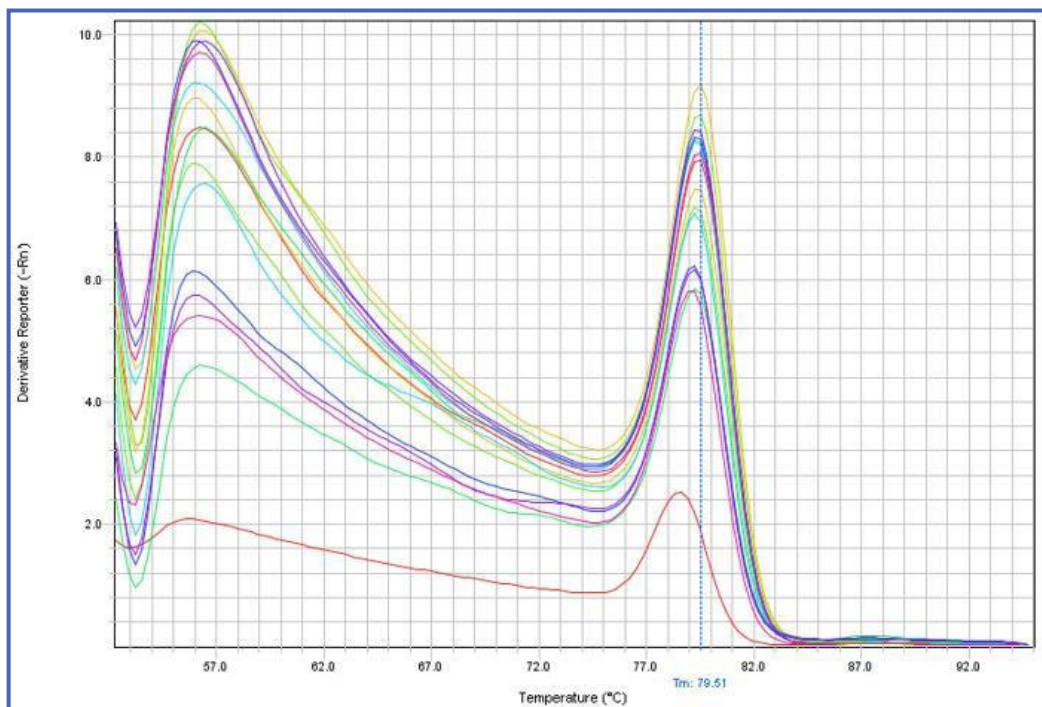


Figura 37. Curva de *melting* para el amplicón de *dgc-II* se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82 °C generado por el amplicón.

9. Gen *treZ*



Figura 38. Curva de amplificación del gen *treZ*

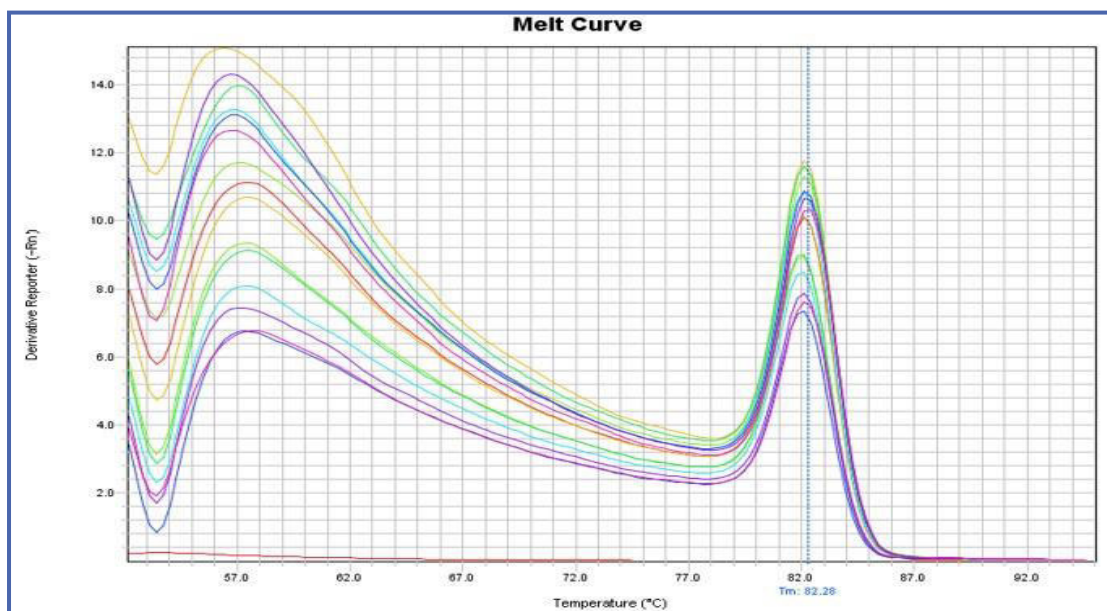


Figura 39. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *treZ*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82°C.

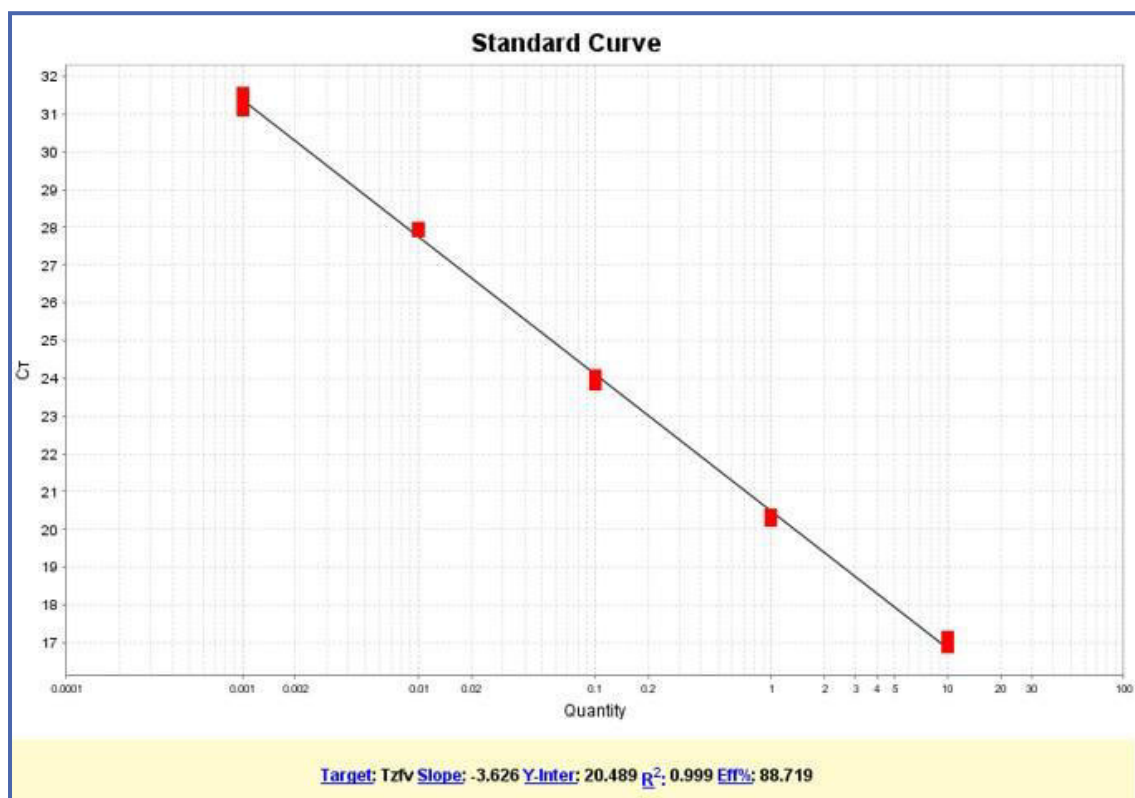


Figura 40. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real

10. Gen *treY*

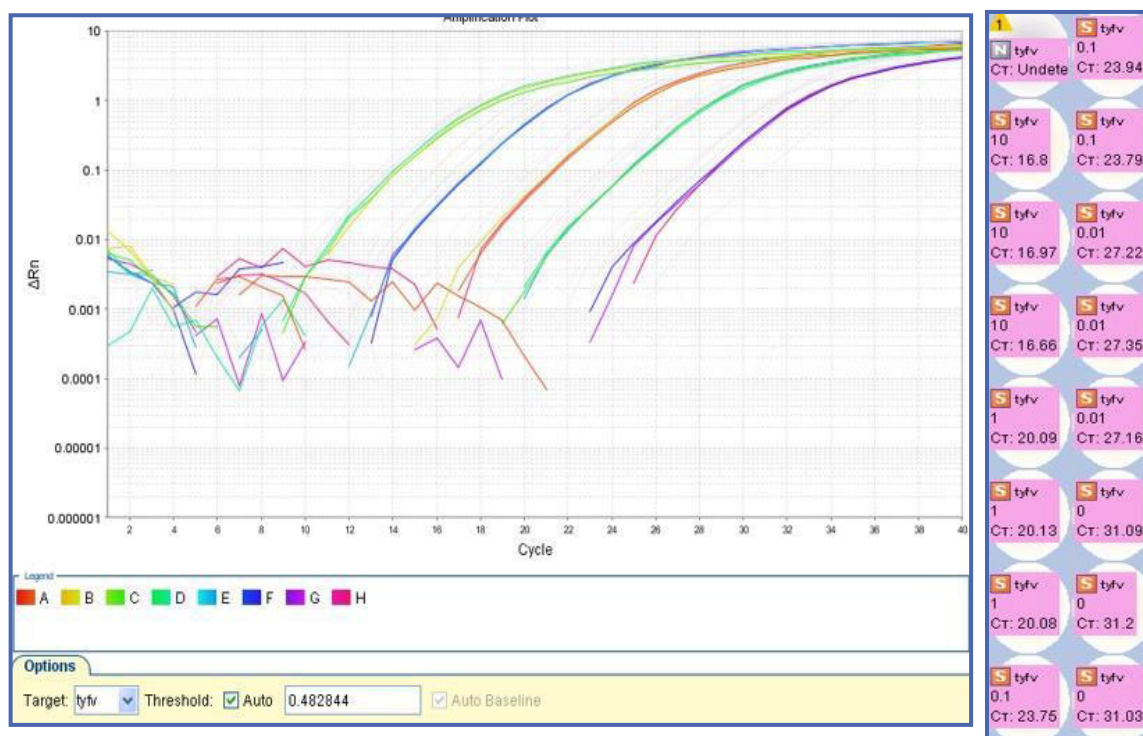


Figura 41. Curva de amplificación.

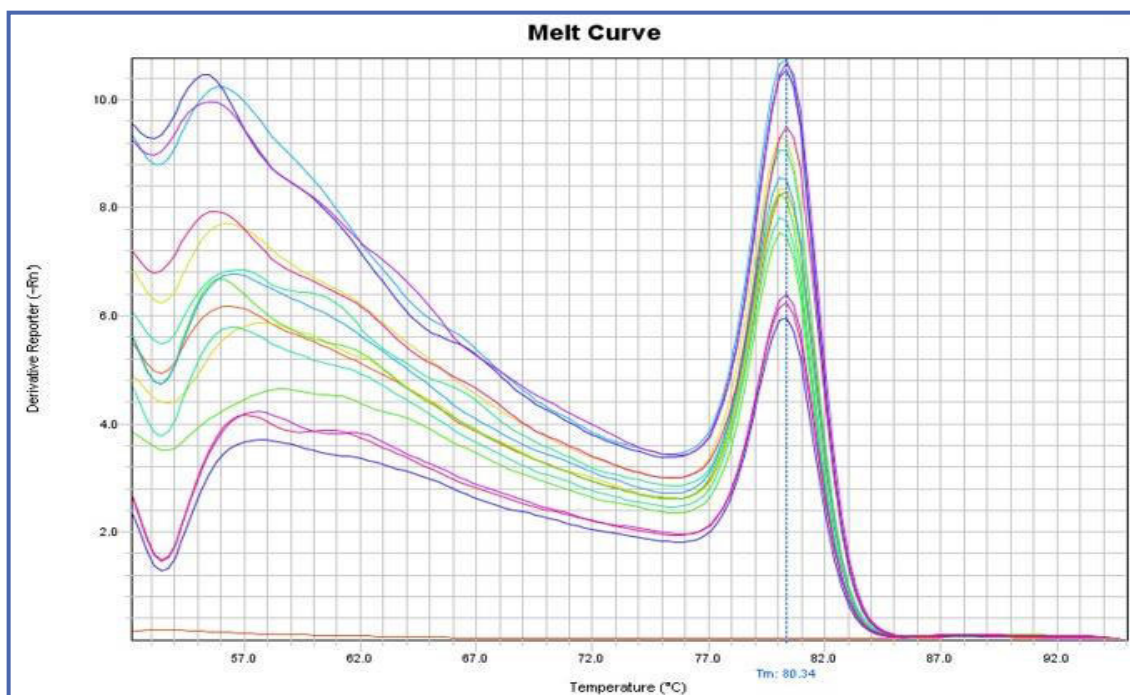


Figura 42. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *treY*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82°C generado por el amplicón.

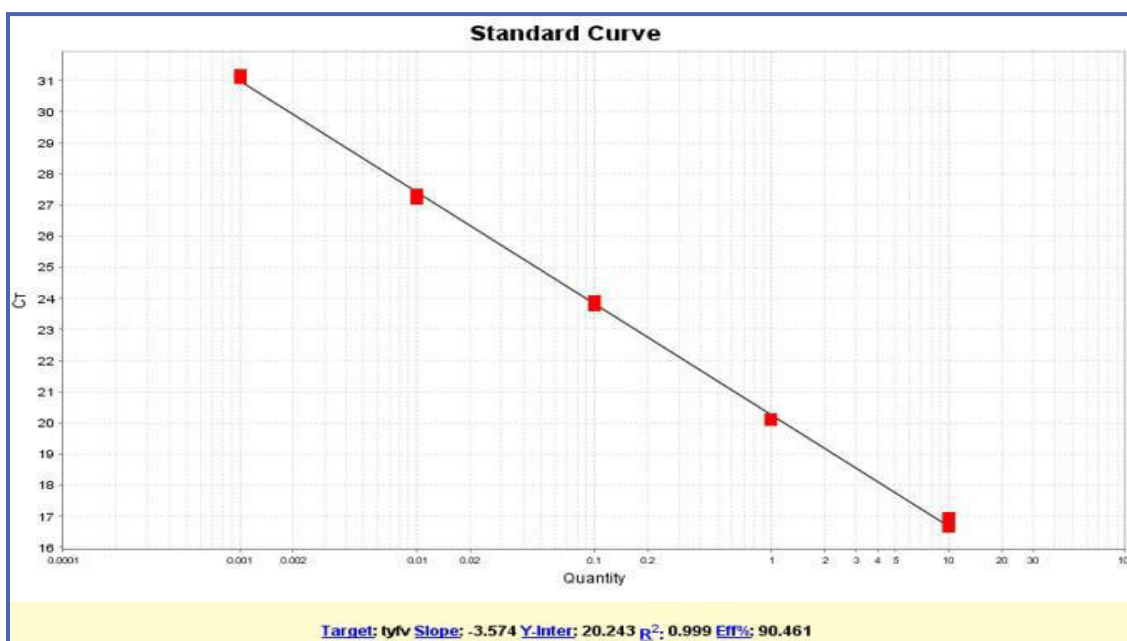


Figura 43. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real

11. Gen *treS*

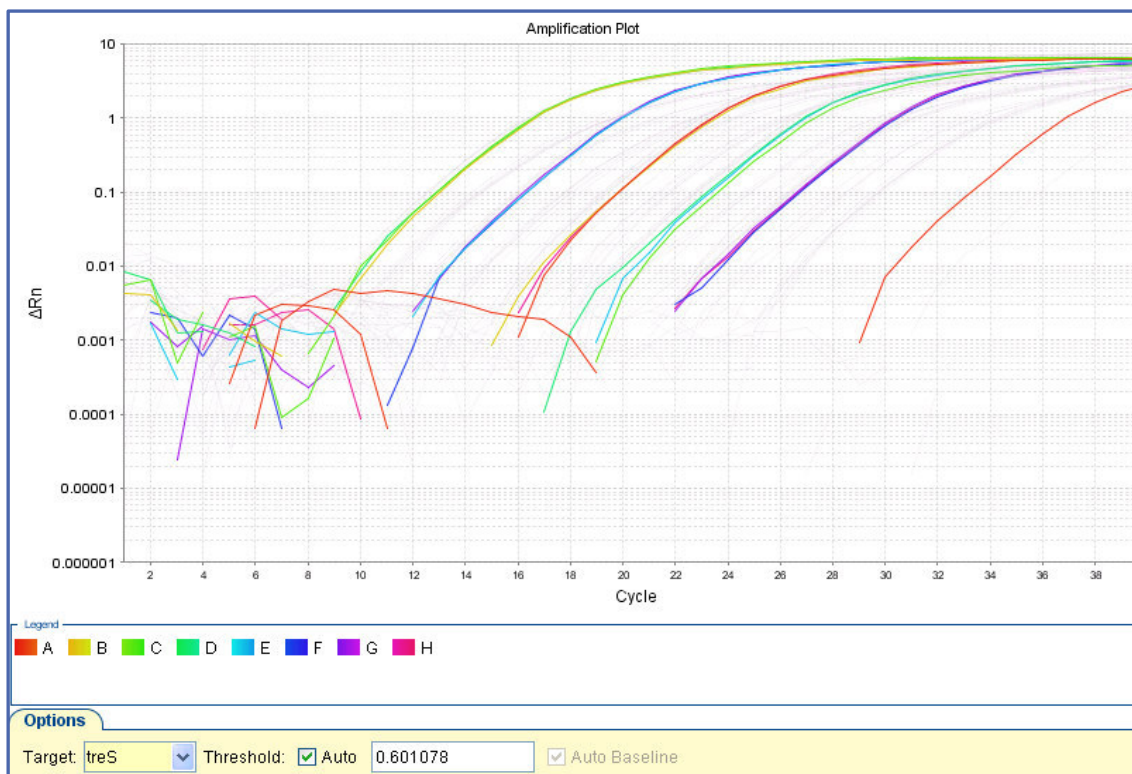


Figura 44. Curva de amplificación para el gen *treS*.

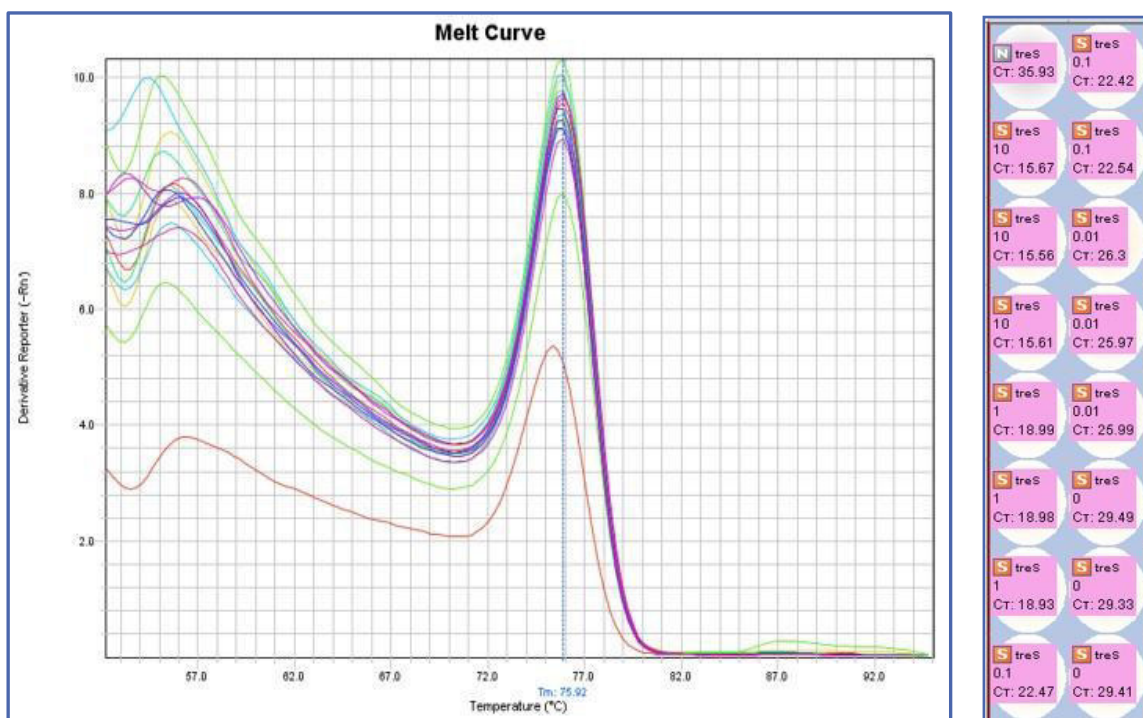


Figura 45. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *treS*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82 °C generado por la disociación del amplicón.

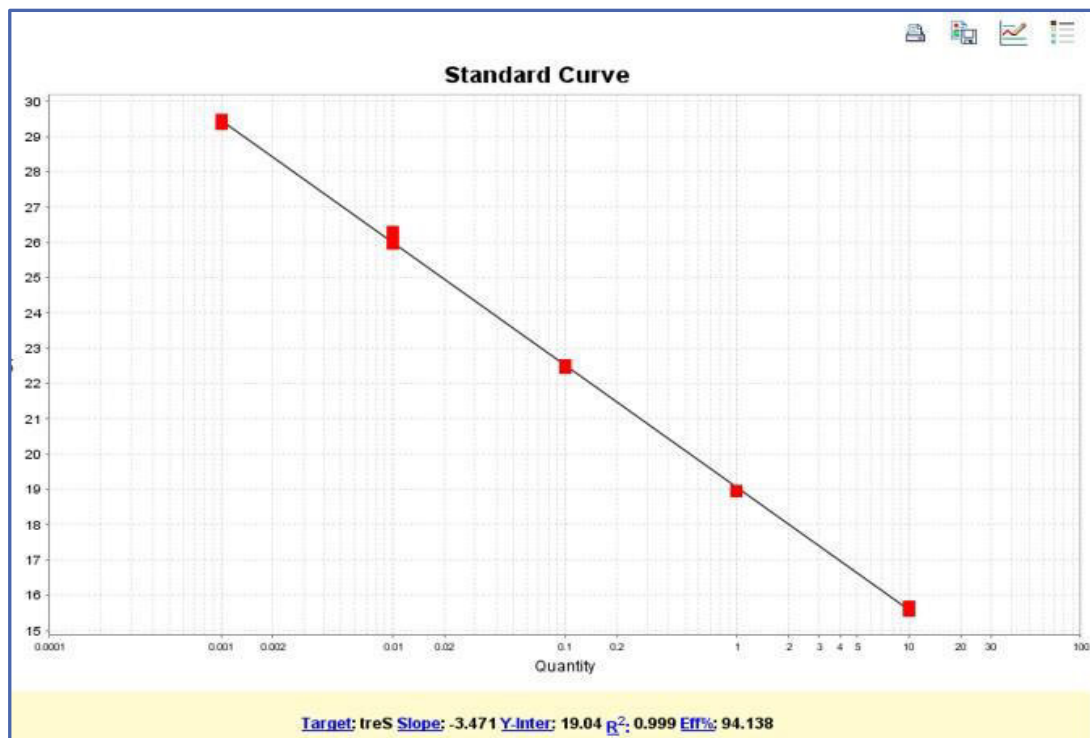


Figura 46. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real del gen *treS*.

12. Gen *glgX*

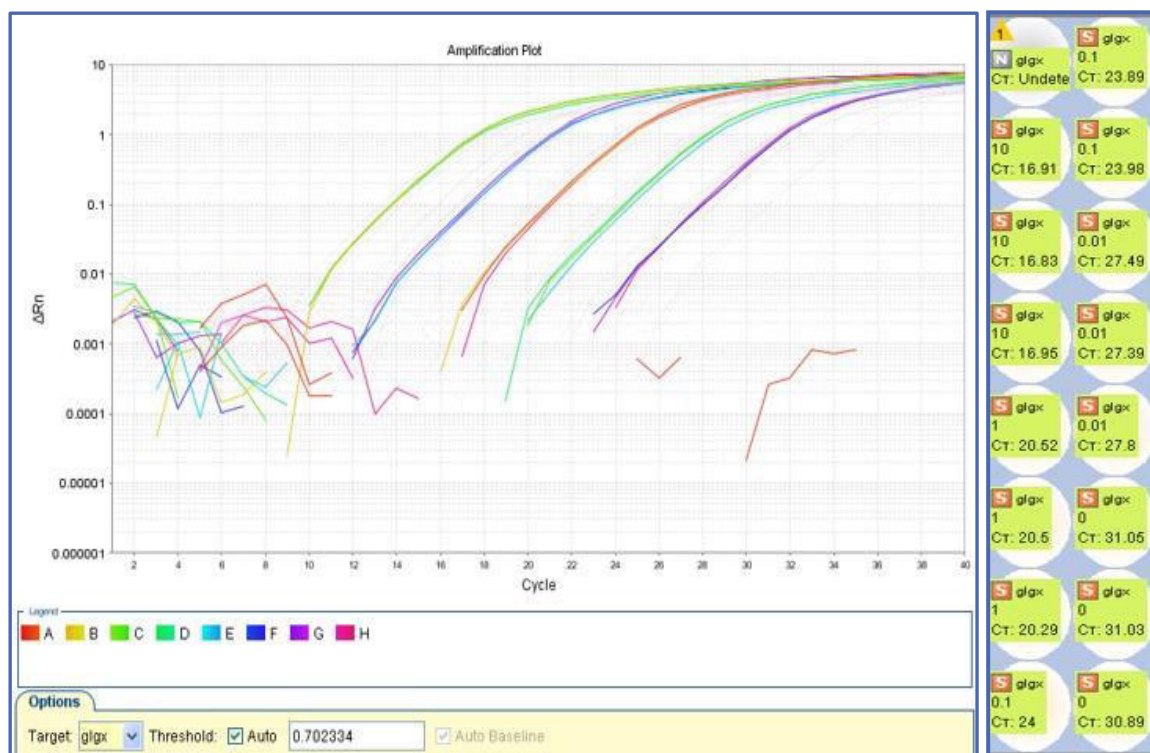


Figura 47. Curva de amplificación para el gen *glgX*.

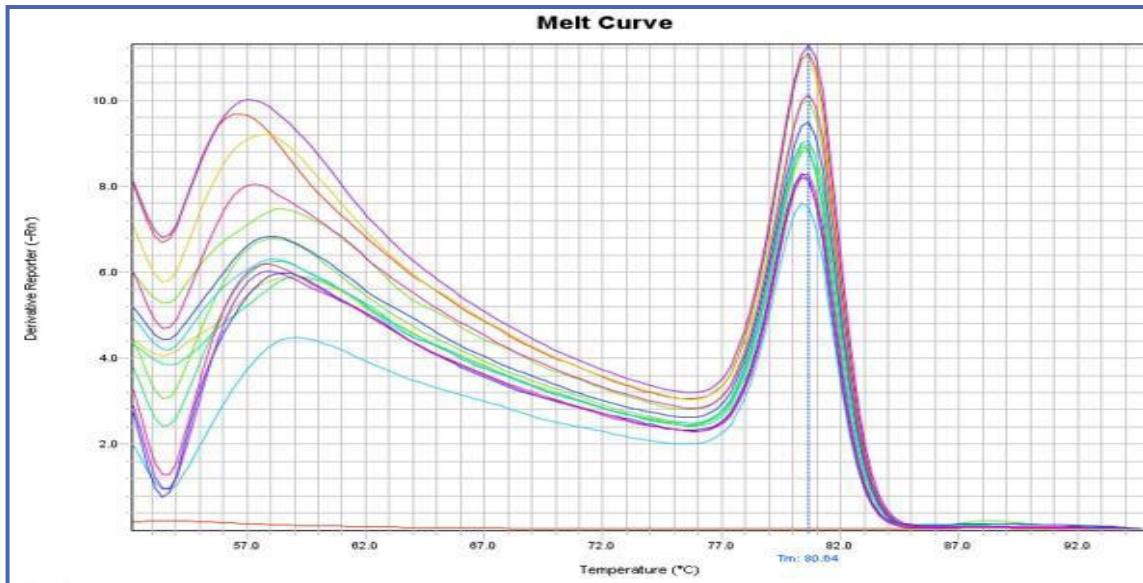


Figura 48. Curva de *melting*, para el amplicón de los *primers* para *glgX*, se observa un pico primario a baja temperatura, dado por estructuras secundarias del amplicón y un pico secundario entre 77-82°C generado por el amplicón.



Figura 49. Ploteo de la curva estándar para la reacción de PCR en tiempo real del gen *glgX*.

Tabla 8. Eficiencias de reacción (E) expresadas en porcentaje, calculadas en función de la pendiente de la curva de calibración ($E\% = 10^{(-1/\text{pendiente de la curva estándar})} \times 100$) para los *primers* diseñados para cada gen indicado en la primera columna, en la segunda columna figura la secuencia de los *primers forward* y *reverse* en sentido 5'-3', en la tercera columna el tamaño del amplicón, en la cuarta columna el porcentaje de eficiencia (E%), en la quinta columna el valor R² de regresión para una función de recta lineal que valida los datos de la curva de calibración (valores cercanos a 1) y en la última columna la temperatura de *annealing* óptima encontrada.

Gen	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	E%	R ² value	Ta (°C)
<i>gyrB</i>	F: GCTGCTGACCTTCTTCTA R: GTGTCGTCCTTGATGTAG	123	94.63%	0.997	58
<i>alaS</i>	F: CATCTGCCCCAAACCCTCT R: GTCGGTGT CATAGTTGTTGTGT	90	94.54%	0.999	54
<i>rpoC</i>	F: TTGCCGACCAGTTGATGTA R: GCCAGAATGCCCTCCTTT	106	95.90%	0.999	58
<i>era</i>	F: TCAGATTCTCGGGATACT R: GACTGCGATAACCACTATG	83	94.99%	0.997	56
<i>treS</i>	F: CACAATAATCCACAGGTAGTCAAG R: GTCCAGCCAGTAGCGTAG	57	94.14%	1	56
<i>glgX</i>	F: CAGCATGGGATGGGAATGG R: CTTGGCATCGAACAGGCAG	83	91.97%	1	56
<i>treZ</i>	F: CGTCTGTTACCAGTTCCTA R: ACGGACCTTGGGCATCTTC	86	88.72%	0.999	58
<i>treY</i>	F: GGACCTACAGTGCCGATGGA R: CCTGGTTTATGGCGGTTTGA	69	90.46%	0.999	58
<i>dgc-I</i>	F: CGCAACATGGATGAAGTAGA R: AGACTCGCCTGAATGCTG	100	95.08%	1	58
<i>dgc-II</i>	F: ATCTCTTCTTGCCGATTA R: CTTGGGATTGGTGCGTTT	71	93.88%	0.997	56
<i>rusA</i>	F: TTTCCATTCCCGAGCTTTGA R: TTGTTGGTGTTGATGAAGGT	98	96.67%	0.996	54
<i>rusB*</i>	F: GGACAGTCAGCGGTAAAAC R: ACGTCGTGGATTTCAAAG	106	--	--	56

*La eficiencia de *rusB* no fue analizada debido a que no hubo expresión a nivel transcripcional.

EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO DE LA CEPA *ACIDITHIOBACILLUS FERRIVORANS* PQ33

Durante 3 generaciones sucesivas de crecimiento a 5°C, se logró observar un crecimiento con una velocidad de duplicación constante en la fase logarítmica, por lo que se pudo delimitar una fase logarítmica entre los 90 y 250 horas, así como un tiempo de duplicación de 86 horas.

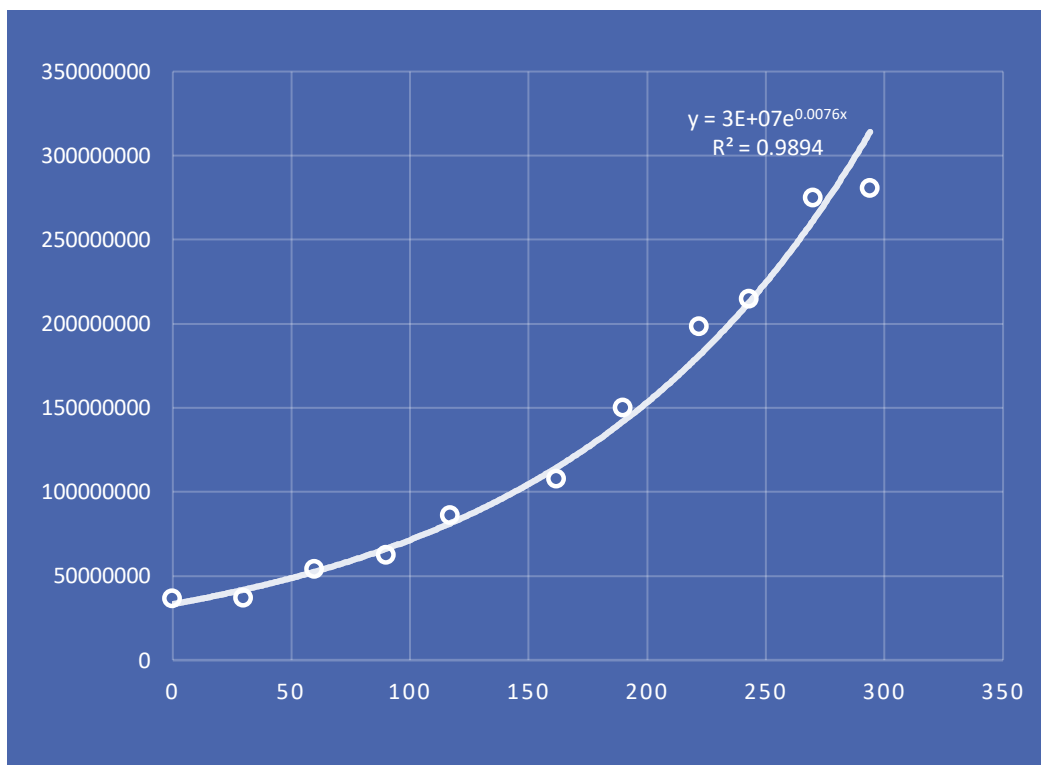


Figura 50. Cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 en frío a 5°C, biomasa en números enteros vs. tiempo en horas.

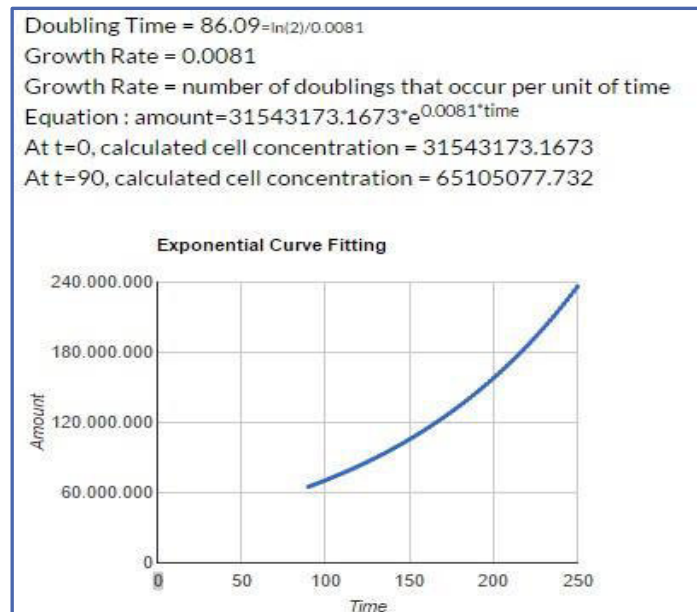


Figura 51. Se observan las características principales de la fase logarítmica del crecimiento de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 a 5°C, tiempo de duplicación: 86 h.

EXTRACCIÓN DE ARN

El protocolo usado permitió obtener ARN con una integridad aceptable, a concentraciones suficientes para los pasos posteriores y una pureza aceptable para la retrotranscripción, todas las lecturas del Neanodrop dieron un rango de absorbancia 260/280 entre 1.85 y 2.15.

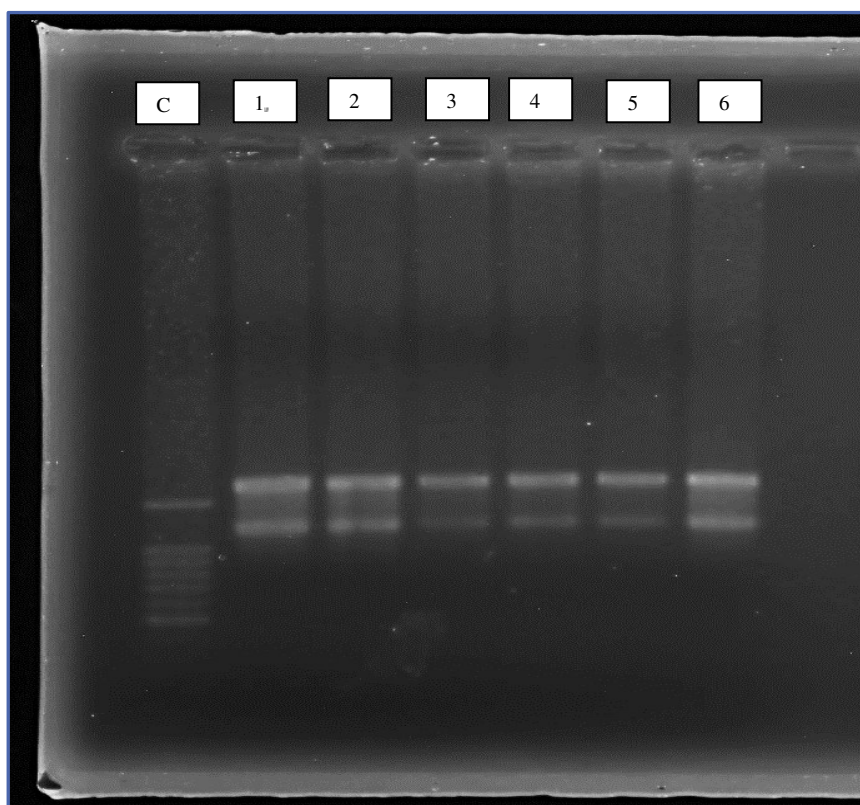


Figura 52. Integridad de la extracción de ARN mostrada en gel de agarosa 1% suplementado con 50 uL de Lejía comercial. C: carril de *leader* de corrida de 50-1000pb. Carriles 1-6: Se observan las bandas características de los ARN ribosomales 23S y 16S, siendo la banda superior de una intensidad superior a la inferior, así como no existiendo *smearing* o degradación después de la segunda banda, ni bandas superiores a 23s, que podrían evidenciar una degradación incompleta del ADN genómico.

VALIDACIÓN DE GENES DE REFERENCIA

De los cuatro genes de referencia candidatos, estudiados para estas condiciones, el algoritmo GeNorm mostró que *gyrB* y *rpoC* eran los pares de genes más estables ($M = 0,362$) seguido por el gen *alaS* ($M = 0,457$), no hubo necesidad de utilizar un gen adicional según literatura. Se obtuvieron resultados similares con el algoritmo NormFinder, siendo el mejor par de genes *alaS* y *gyrB* con un valor de estabilidad para la mejor combinación de dos genes de 0,087. De acuerdo con estos resultados, *era* fue excluido por ser el menos estable en estas condiciones.

Se seleccionó un conjunto de tres genes de referencia (*gyrB*, *alaS* y *rpoC*) para realizar la cuantificación relativa RT-qPCR.

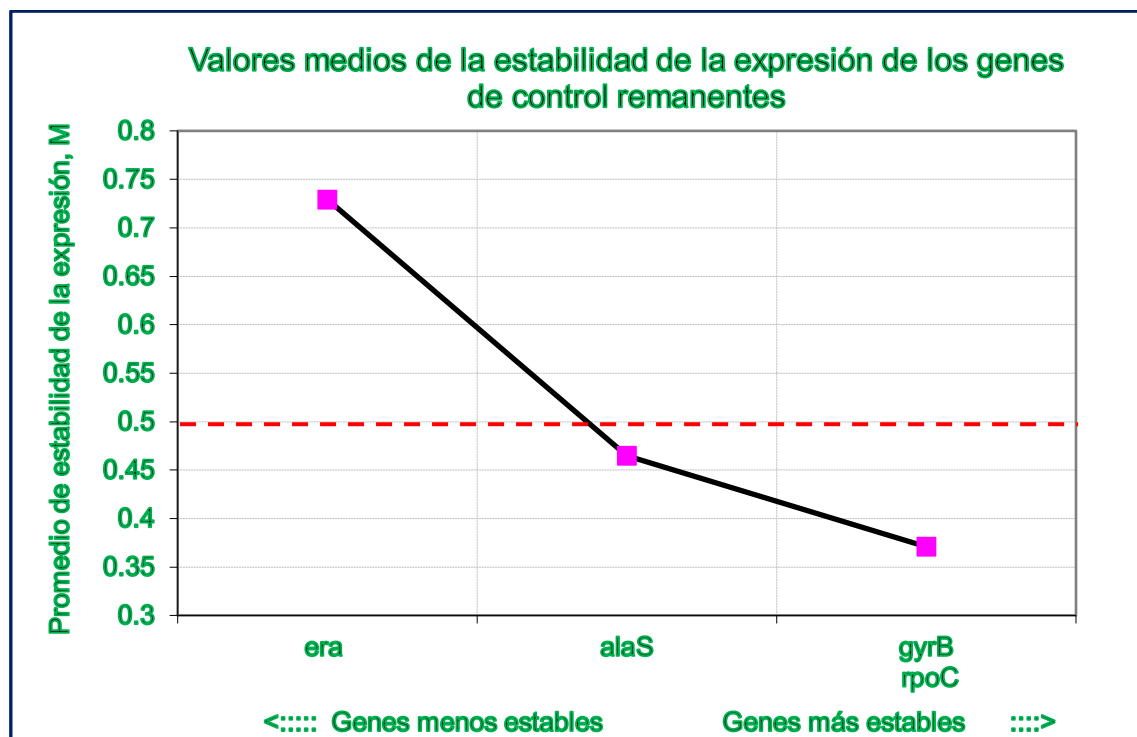


Figura 53. Valores de estabilidad genética M hallados por GeNorm, un valor debajo de umbral aceptable (0.5) es suficiente para que, junto a refuerzo de literatura, se pueda seleccionar genes de referencia.

PCR EN TIEMPO REAL

Ninguno de los genes analizados y teorizados para conferir la adaptación relacionada con el frío mostraron sobreexpresión a bajas temperaturas, de forma más llamativa 3 genes mostraron más abundancia de transcritos a temperatura control (21°C) que, a 5°C, estos genes fueron: *treS* y los genes codificantes de diguanilato ciclasa encontrados en la cepa de *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33.

Según la estadística usada para el análisis de resultados (estadística de iteración) con 10000 repeticiones; el resto de genes analizados no mostró variaciones estadísticamente significativas.

Con respecto a los parámetros de control de calidad en los resultados del RT-qPCR, solamente se observó un pico de radiación durante el análisis de curva de *melting*. Indicando la amplificación específica y sin falsos positivos. Los niveles de C_t promedio para cada gen oscilaron entre 20 y 26, dentro del rango aceptable para la buena determinación relativa (mayor a 35 debe ser considerado indetectable o trazas mínimas de contaminación genómica).

Los controles de retrotranscripción dieron resultados de C_t cerca y sobre 35 (entre 34 y 39) indicando cantidades ínfimas de ADN genómico contaminante. Los controles negativos no dieron valores de C_t detectables.

El gen *rusB* no fue incluido en el análisis del software REST2009, debido a que no presentó valores concluyentes de expresión: los valores de C_t de *rusB* para ambas condiciones mostraban valores indetectables y de $C_t > 35$. *treY* y *glgX* no fueron incluidos debido a que pertenecen al mismo sistema enzimático cuyo efector final es *treZ*.

Resultados de Valores de Expresión							
Parameter	Value						
Iterations	10000						

Gene	Type	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	Pvalue (H1)	Result
<i>gyrB</i>	REF	0.9463	0.960				
<i>alaS</i>	REF	0.9454	0.750				
<i>rpoC</i>	REF	0.9390	1.388				
<i>rusA</i>	TRG	0.9667	1.904	0.804-1.484	0.663-1.680	0.732	
<i>treZ</i>	TRG	0.8872	0.829	0.599-1.225	0.524-1.473	0.432	
<i>treS</i>	TRG	0.9414	0.250	0.188-0.320	0.160-0.410	0.037	Down
<i>dgcII</i>	TRG	0.9388	0.144	0.067-0.497	0.055-0.574	0.000	Down
<i>dgcI</i>	TRG	0.9508	0.169	0.162-0.178	0.155-0.179	0.033	Down

Figura 54. Valores de expresión obtenidos para los genes analizados en esta investigación. REF: gen de referencia. TRG: genes analizados según tratamiento (5°). Los valores estadísticos de variación estándar (Std. Error) Intervalo de confianza (95% C.I) y valor P de significancia, Para *tres*, *dgc-II* y *dgc-I*, se rechaza la hipótesis nula: Los valores de expresión son diferentes en ambas condiciones, la cantidad de transcriptos es más abundante en la condición control a 21°C.

Expresión Relativa

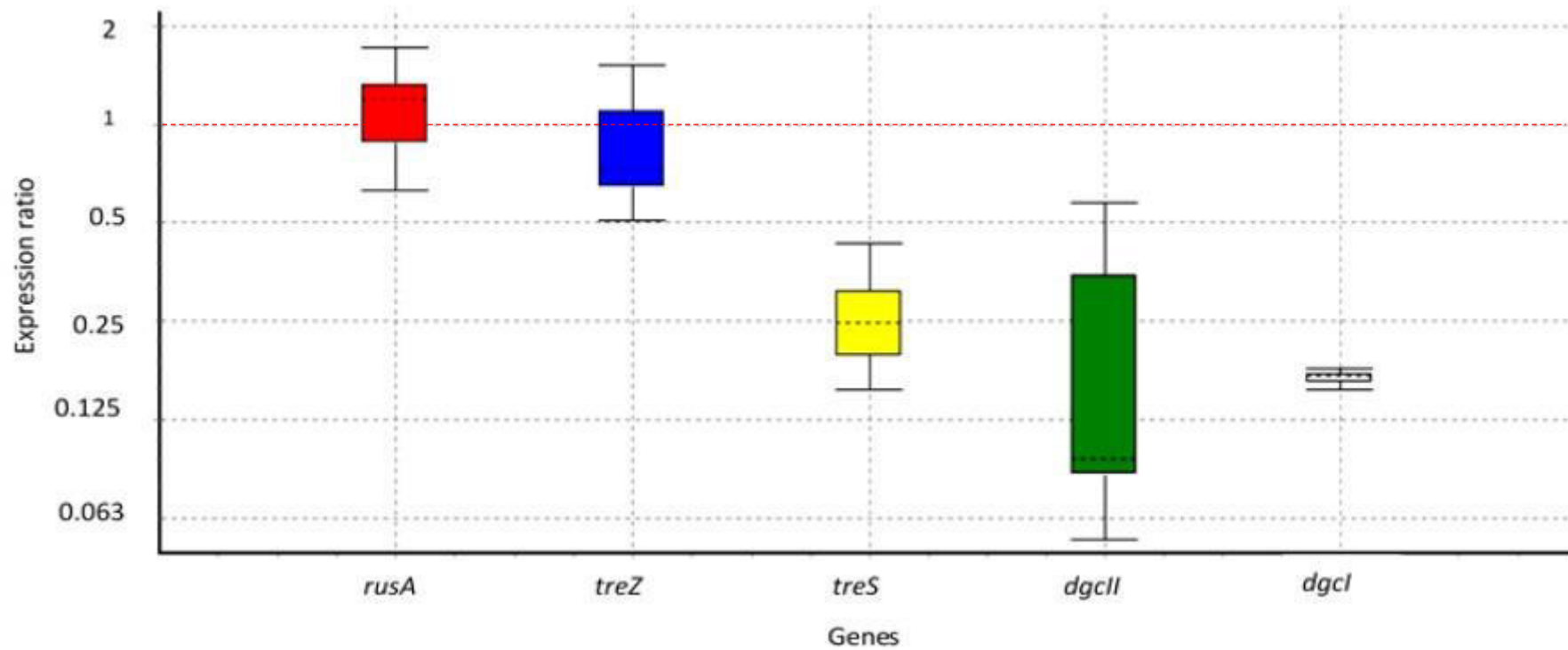


Figura 55. Diagrama de cajas y bigotes para los 5 genes analizados en el qPCR de expresión relativa, la expresión no diferencial está cercana al punto de radio de expresión (*Expression Ratio*) de 1, representado con la línea roja.

VI. DISCUSIÓN

Si bien se reconoce a la plataforma del PCR en tiempo real como el método de análisis de expresión genética más exacto o *gold standard*, esta propiedad depende mucho del monitoreo de los controles de calidad en cada paso, que son los que determinan la confiabilidad de los resultados. De esta manera, según Derveaux *et al.*, (2010) cada paso metodológico de este tipo de análisis arroja resultados que deben ser contrastados con valores umbrales aceptables. Con respecto al diseño de *primers*, los valores de energía libre y estabilidad de estructura secundaria encontrados en este estudio van acorde con lo recomendado por las guías MIQE (Bustin *et al.*, 2009). Además, tal como estos autores han recomendado, se usó el diseño experimental basado en maximización de muestras (un mismo gen con la mayor cantidad de muestras experimentales y controles en la misma placa de corrida) por sobre la maximización de genes (la mayor cantidad de genes en la misma placa de corrida para el mismo organismo analizado), de esta manera se evita el error producto de la variación entre los experimentos.

Asimismo, otro vicio extendido en los análisis de expresión relativa de RT-qPCR es el de usar muy pocos genes de referencia (menores a tres) no validados para las condiciones experimentales seleccionadas, en este estudio se cumplió con los requisitos recomendados por Bustin *et al.*, 2009 al usar como mínimo tres genes de referencia validados; además de esto, como los autores anteriormente citados señalan, debe evitarse la nomenclatura *housekeeping* y reemplazarla por “gen de referencia” ya que muchos genes catalogados como *housekeeping* (genes que cumplen funciones basales en la célula y siempre serán expresados a niveles relativamente constantes) pueden presentar variaciones en tratamientos experimentales distintos, mientras que un “gen de referencia” es aquel que mantiene constante su expresión entre una condición control y una condición estudiada.

Según Hallberg *et al.*, (2010), *Acidithiobacillus ferrivorans* es una especie con una capacidad de crecimiento a temperaturas extremadamente bajas (5°C), esta fue la temperatura elegida para la presente investigación, ya que se observaron tasas de crecimiento constante con una fase logarítmica adecuada para estudios de RT-qPCR. La temperatura de control para este estudio fue de 21°C, lo más cerca posible de la temperatura óptima teórica reportada para esta especie.

Un reciente estudio de metagenómica (Liljeqvist *et al.*, 2015) en comunidades bacterianas que prosperan a bajas temperaturas en drenajes de minas muestran que estas bacterias contienen en su genoma todas las cinco vías requeridas para la síntesis de trehalosa, por lo que este metabolito jugaría un papel crucial en la psicotolerancia y osmorregulación. Un estudio reciente del análisis transcriptómico en *A. ferrivorans* (Christel *et al.*, 2016) mostró que muchos genes que se pensaba que eran sobreexpresados a bajas temperaturas no mostraron variación durante su expresión a 8 °C, incluidos los genes de la vía trehalosa. Igualmente, nuestros resultados, con respecto al análisis de expresión de los genes implicados en la vía trehalosa muestran que no tienen variación entre el control y una condición de tratamiento tan baja como 5 °C, estos resultados indican que los niveles de expresión de estos genes se mantienen invariablemente entre temperaturas, estos resultados amplían las evidencias de que esta especie no experimenta una maquinaria genética de adaptación al frío sino que se adapta constantemente a vivir en temperaturas frías, cambiando su estado de clasificación fisiológica de psicotolerante a euripsicrófilo.

El trabajo proteómico en la cepa D6 (Myckzytuk *et al.*, 2011) en *A. ferrivorans* mostró sobreexpresión de proteínas relacionadas con el metabolismo, específicamente la proteína Rusticianina A, aumentando 4 veces a 5 °C en comparación con su crecimiento a 21 °C. Asimismo, el trabajo transcriptómico de Christel *et al.*, (2016) indica que la transcripción del gen rusticianina A, en un crecimiento a 8°C, se sobreexpresa dos veces

con respecto al control a 20°C. Estos resultados demuestran claramente que Rusticianina A puede tener un papel importante en la adaptación al frío, sin embargo, nuestros análisis no muestran cambios en la expresión de la cepa PQ33, esto podría indicar una expresión variable en este gen para diferentes cepas a este tipo de temperaturas (4 veces para D6, 2 veces para SS3, sin variación para PQ33), demostrando que podría haber adaptaciones al entorno mediante la fijación de diferentes secuencias de nucleótidos en el gen de la rusticianina para cada cepa, la aparición de isoformas de la proteína en este u otros genes relacionados con la oxidación del hierro mediante mecanismos post transcripcionales aún no conocidos, asimismo podrían haber variantes adaptativas de los diferentes factores de transcripción que regulan el operon *rus*, las cuales son necesarias de investigar más a fondo en el futuro, es posible que más de un mecanismo de adaptación al frío está presente en el operón *rus* y proteínas relacionadas.

Asimismo, es importante señalar que los estudios mencionados anteriormente usan concentraciones de sustrato (ion férrico) diferentes a las de este estudio: Mientras que Christel et al., usan solamente una generación pre-análisis creciendo en ión férrico a una concentración de 50 mM, Mykytczuk *et al.*, 2011, utilizan 120 mM en tres pasajes consecutivos mientras que este estudio utiliza una concentración de ion férrico de 160 mM, Al igual que con las temperaturas, estas diferencias de concentración de sustrato no tienen una relación proporcional con la abundancia de transcritos hallados para el gen *rusA*, sin embargo, para poder descartar todas a las diferencias de concentración de sustrato como un factor importante en la diferencia de transcritos, son necesarios más experimentos igualando la concentración de iones férricos.

Uno de los mecanismos más importantes de la formación de *biofilm* y adhesión al sustrato está mediada por el diguanilato monofosfato cíclico (ci-di-GMP) (Castro *et al.*, 2009). La formación de *biofilm* se ha propuesto como un mecanismo importante para la

adaptación al frío, como se observa en otras especies (Mancuso et al. 2004). La presente investigación muestra que ninguno de los genes de las enzimas diguanilato ciclasas analizados estuvieron sobrerregulados a condiciones de baja temperatura, y si lo estuvieron a 21°C. En un caso diferente, el trabajo transcriptómico sobre la cepa SS3 (Christel *et al.*, 2016) muestran diferentes comportamientos para diferentes genes que codifican para diguanilato ciclasas. La existencia de varios diguanilato ciclasas que codifican genes es ampliamente conocida (Mancuso *et al.*, 2004), además, existen varias vías de inducción conocidas por su transcripción. La evidencia de la mayor cantidad de transcriptos para las diguanilato ciclasas a 21°C en la cepa PQ33 podría explicarse por el papel de detección de quórum (*quorum sensing*) que esta molécula tiene, durante el crecimiento exponencial de la cepa en condiciones óptimas. También es posible que se necesite un mayor análisis sobre las secuencias promotoras de los genes que codifican para las diguanilato ciclasas, y se hagan estudios de expresión con el resto de genes de diguanilato ciclasas que abundan en el genoma de la cepa PQ33. Esto último no es posible con un análisis de RT-qPCR, ya que una de las condiciones para realizar un estudio comparativo adecuado es que el gen se presente como copia única en el genoma y no haya posibilidad de error al cuantificar transcriptos idénticos que se generen por dos causas o vías metabólicas diferentes.

Uno de los genes que codifican una enzima de síntesis de trehalosa (TreS) mostró sobreexpresión en condiciones de control (21°C), además de su papel como molécula de crioprotección, la trehalosa ha sido conocida como un osmoprotector (Moreno Paz *et al.*, 2010) y la oxidación rápida de hierro y el flujo de iones y el eflujo durante las condiciones óptimas de cultivo puede ser la causa de que este gen haya sido sobre regulado a 21 °C.

La no expresión del gen *rusB* indicaría la presencia de esa secuencia nucleotídica en el genoma de *Acidithiobacillus ferrivorans* como un pseudogén: Aun no se ha reportado su

función ni bajo qué condiciones podría conferir alguna ventaja adaptativa (Liljeqvist et al, 2012). Ya que no se han reportados evidencias de su expresión en otros trabajos de análisis de transcriptos (Christel *et al.*, 2015)

VII. CONCLUSIONES

1. Los genes hipotetizados en ser *housekeeping genes* o genes de referencia cumplieron las condiciones de expresión constante entre el control y el tratamiento requeridas para este propósito, determinando un grupo de genes de referencia para ensayos a bajas temperaturas en esta especie.
2. *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 ha demostrado menos adaptaciones moleculares al frío (expresión genética) de lo previamente teorizado para el gen metabólico analizado en esta investigación (*rusA*), otros mecanismos de adaptación a nivel de mutaciones, factores de transcripción o estructura secundaria deben ser investigados para conocer más sobre las adaptaciones de este gen en contraste con otras cepas de la misma especie.
3. La expresión constante de genes relacionados con la ruta trehalosa en ambas condiciones, así como el gen metabólico de la Rusticianina, refuerza la opinión actual categorizando a esta especie como *Eurypsichrophila* en lugar de *Psicrotolerante*.
4. Todos los *primers* diseñados y ensayos han demostrado ser apropiados para los experimentos aquí descritos y futuros experimentos de expresión genética de esta cepa a condiciones de baja temperatura, así como el ensayo de crecimiento de la cepa PQ33 en a 5°C, demostrando que esta cepa si puede realizar un crecimiento con fase logarítmica a estas condiciones.

VIII. RECOMENDACIONES

1. A pesar de haber necesitado 3 pasos de digestión de ADN genómico, no se recomienda usar menor cantidad de biomasa, ya que de esta cantidad se obtuvo una buena pureza e integridad, además que la concentración de ARN obtenida estuvo en el mínimo necesario para el paso de retrotranscripción.
2. La técnica del Gel de agarosa suplementada con lejía comercial Bleach Gel[®] descrita por Aranda *et al.*, (2012) es ideal para conocer la integridad del ARN de una manera, sencilla, económica y rápida, a diferencia de otras técnicas que requieren incubación de la mezcla y mayor riesgo de desestabilización, la electroforesis Bleach Gel[®] se puede realizar inmediatamente después de la extracción de ARN, otorgando mayor certeza sobre la capacidad del protocolo usado para mantener el ARN intacto.
3. Si bien los genes de referencia han sido validados para esta especie, se debe tomar en cuenta que su validación ha sido hecha solo en las condiciones investigadas, nuevas validaciones deben hacerse para estudiar la expresión genética de esta especie en cualquier otro par de condiciones que no sean las testeadas (temperatura 5°C y crecimiento en 9K + Fe vs. temperatura 21°C y crecimiento 9K + Fe²⁺).
4. Se recomiendan análisis exhaustivos del gen *rusA*, tanto secuencia codificante y secuencias promotoras, asimismo estudiar a la proteína Rusticianina de la cepa PQ33 a nivel conformacional, ya que se debe dilucidar cuál es la razón por la cual el nivel de transcriptos no varía a pesar que en otros miembros de su especie se da este cambio, tan necesario para la oxidación del hierro a eficiencias similares a la de la cepa aquí estudiada.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANTO, M; PARIONA, N, CALDERON, J; GUERRA, G; RAMIREZ, R; DE LA CRUZ-CALVO, F.; RAMIREZ, P. (2013) *Molecular Identification of Iron Oxidizing Bacteria Isolated from Acid Mine Drainages in Peru*. Advanced Materials Research Vol. 825, 84-87.

ARANDA, PATRICK; LAJOIE, Dollie; JORCYK, Cheryl. (2012) *Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality*. *ELECTROPHORESIS* 33 (2):366-369.

BUSTIN, S., BENES, V., GARSON, J., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., & KUBISTA, M. ET AL. (2009). *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-622. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

M. CASTRO, L. M. RUÍZ, A. BARRIGA, C. A. JEREZ, D. S. HOLMES, N. GUILIANI, "C-DI-GMP PATHWAY IN BIOMINING BACTERIA" (2009) *Advanced Materials Research*, Vol. 71-73, pp. 223-226.

CHRISTEL, S., FRIDLUND, J., WATKIN, E.L. (2016). *Acidithiobacillus ferrivorans SS3 presents little RNA transcript response related to cold stress during growth at 8 C suggesting it is a eurypsychrophile*. *Extremophiles* 20: 903. doi:10.1007/s00792-016-0882-2

CCORAHUA-SANTO R, ECA A, ABANTO M, GUERRA G, RAMÍREZ P. (2017). *Physiological and comparative genomic analysis of Acidithiobacillus ferrivorans PQ33 provides psychrotolerant fitness evidence for oxidation at low temperature*. *Research in Microbiology*.

COX J y BOXER D. (1978) *The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from Thiobacillus ferro-oxidans*. *Biochemical Journal*. 174(2):497-502.

DERVEAUX, S., VANDESOMPELE, J., & HELLEMANS, J. (2010). *How to do successful gene expression analysis using real-time PCR*. *Methods*, 50(4), 227-230.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.11.001>

EDWARDS, U., ROGALL, T., BLOCKER, H., EMDE, M. y BOTTGER, E. C. (1989). *Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA*. *Nucleic Acids Res* 17, 7843-7853

ESCOBAR B, BUCCICARDI S, MORALES G, WIERTZ J. (2009). *Bacterial Oxidation of Ferrous Iron and RISCs at Low Temperatures: Their Effect on Acid Mine Drainage and Bioleaching of Sulphide Minerals*. *Advanced Materials Research* 71-73:433-436.

FERRONI, G.D., LEDUC, L.G. y TODD, M. (1986). *Isolation and temperature characterization of psychrotrophic strains of Thiobacillus ferrooxidans from the environment of an uranium mine*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 32:169-175

HALLBERG KB, GONZÁLEZ-TORIL E, JOHNSON DB (2010). *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14: 9–19.

HOLMES, D. S. y BONNEFOY, V. (2007) *Genetic and Bioinformatic Insights into Iron and Sulfur Oxidation Mechanisms of Bioleaching Organisms*. Libro: Biomining 2007, pp 281-307.

JOHNSON B. (2013). *Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. Hydrometallurgy*. Environ Sci Pollut Res, DOI 10.1007/s11356-013-1482-7.

JOHNSON DB, ROLFE S, HALLBERG KB, IVERSEN E (2001). *Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine*. Environ Microbiol 3:630–637

KARAVAIKO GI, TOUROVA TP, KONDRAT'EVA TF, LYSENKO AM, KOLGANOVA TV, AGEEVA SN et al. (2003) *Phylogenetic heterogeneity of the species Acidithiobacillus ferrooxidans*. Int J Syst Evol Microbiol 53:113–119

KUPKA D, RZHEPISHEVSKA O, DOPSON M, LINDSTRÖM E, KARNACHUK O, TUOVINEN O. (2007). *Bacterial oxidation of ferrous iron at low temperatures*. Biotechnology and Bioengineering 97(6):1470-1478.

LEDUC L, TREVORS J, FERRONI G. (1993). *Thermal characterization of different isolates of Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiology Letters 108(2):189-193.

LEFIMIL C, JEDLICKI E, HOLMES D. (2014). -fur, an antisense RNA gene to fur in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Microbiology 160(Pt_3):514-524.

LILJEQVIST M, VALDES J, HOLMES DS, DOPSON M (2011) *Draft genome of the psychrotolerant acidophile Acidithiobacillus ferrivorans SS3*. J Bacteriol 193:4304–4305

LILJEQVIST M., RZHEPISHEVSKA O. y DOPSON M. (2012) *Gene Identification and Substrate Regulation Provide Insights into Sulfur Accumulation during Bioleaching with*

the Psychrotolerant Acidophile Acidithiobacillus ferrivorans. Applied and Environmental Microbiology Volume 79 Number 3 p. 951–957

LILJEQVIST, M. (2012). *Genomics, physiology and applications of cold tolerant acidophiles*. Umeå University, Suecia.

LILJEQVIST M., OSSANDON F., GONZÁLEZ C., RAJAN S., STELL A., VALDES J., HOLMES D., DOPSON M. (2015). *Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream*. FEMS Microbiol Ecol. 2015 Apr;91(4). pii: fiv011. doi: 10.1093/femsec/fiv011. Epub 2015 Jan 27.

MANCUSO NICHOLS, S. GARON, J.P. BOWMAN, G. RAGUÉNÈS, J. GUÉZENNEC (2004). *Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates*. Journal of Applied Microbiology 96:1057–1066

The Mfold Web Server mfold.rna.albany.edu [Internet] Disponible en <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold> citado el 30 de julio del 2017.

MYKYTCZUK N. TREVORS J FOOTE. S LEDUC, L FERRONI G TWINE S. (2011). *Proteomic insights into cold adaptation of psychrotrophic and mesophilic Acidithiobacillus ferrooxidans strains*. Antonie van Leeuwenhoek 100:259–277

NIETO, P, COVARRUBIAS P., JEDLICKI, E. HOLMES D.AND QUATRINI R. (2009). *Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile Acidithiobacillus ferrooxidans*. BMC Molecular Biology 2009 10:63 DOI: 10.1186/1471-2199-10-63

IDT Oligo Analyzer - Integrated DNA Technologies [Internet] Disponible en: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> citado el 30 de Julio del 2017

OSSA HENAO D, VICENTINI R, DRUMOND RODRIGUES V, BEVILAQUA D MARISCAL OTTOBONI L (2014). *Differential gene expression in Acidithiobacillus ferrooxidans LR planktonic and attached cells in the presence of chalcopyrite*. J. Basic Microbiol. 54, 1–825.

(Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA) [Internet] Disponible en: <http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html> Citado el 30 de julio del 2017

QUATRINI R, APPIA-AYME C, DENIS Y, JEDLICKI E, HOLMES D AND BONNEFOY V (2009) *Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile Acidithiobacillus ferrooxidans*. BMC Genomics 10:394

RAWLINGS D JOHNSON B. Biomining. 1st ed. Berlin: Springer; 2010.

SCHIPPERS A, HEDRICH S, VASTERS J, SAND W., WILLSCHEER S. DROBE M. (2013). *Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms*. Adv Biochem Eng Biotechnol Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp. 216-263

SVEC D, TICHOPAD A, NOVOSADOVA V, PFAFFL M, KUBISTA M. (2015). *How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments*. Biomolecular Detection and Quantification 3:9-16.

TAYLOR S, WAKEM M, DIJKMAN G, ALSARRAJ M, NGUYEN M. (2010). *A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines*. Methods. 50(4):S1-S5.

Talvivaara Mining Company Financial Statements. 2011. [Internet]. taalvivaara.com. 2011 [citado 11 Marzo 2017]. Disponible en:

http://www.talvivaara.com/files/talvivaara/AR%202011%20%2B%20parts/AR_Financial_Statements_2011.pdf

TALLA, E., HEDRICH, S., MANGENOT, S., JI, B., JOHNSON, D., BARBE, V., & BONNEFOY, V. (2014). *Insights into the pathways of iron- and sulfur-oxidation, and biofilm formation from the chemolithotrophic acidophile Acidithiobacillus ferrivorans CF27. Research In Microbiology*, 165(9), 753-760.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.002>

THORNTON B, BASU C. (2011). *Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software*. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39(2):145-154.

VERA M., SCHIPPERS A, SAND W., (2013). *Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A*. Mini Review. *Appl Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00253-013-4954-2

X. ANEXO

Se anexa adjunta a esta tesis la publicación fruto de esta investigación, expuesta en el International Biohydrometallurgy Symposium (IBS) 2017 en Freiberg, Alemania.

Este trabajo científico fue publicado en la revista Solid State Phenomena en Agosto del 2017.

Expression of Candidate Cold Stress and Metabolic Related Genes in *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 Strain Using Ferrous Iron as Electron Donor

Gregory Guerra-Bieberach^{1,a}, Robert Ccorahua-Santo^{1,b}, Anika Eca^{1,c}, Jordan Bernaldo^{1,d}, Tito Sánchez^{1,e}, Chachi Rojas-Ayala^{2,f}, Pablo Ramirez^{1,g*}

¹Laboratory of Molecular Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru

²Mössbauer Laboratory, Faculty of Physical Sciences, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru

E-mail: ^aguerragregory90@gmail.com, ^brobertcsanto13@gmail.com, ^canikaeca@gmail.com, ^djbernaldoa@gmail.com, ^ebioambiente@hotmail.com, ^fcrojasa@unmsm.edu.pe, ^gpramirezr@unmsm.edu.pe*

Keywords: *Acidithiobacillus ferrivorans*, gene expression, RT-qPCR, low temperature, bioleaching

Abstract. The identification of genes involved in cold adaptations of psychrotolerant bacteria *Acidithiobacillus ferrivorans* is important for biomining processes that take place at low temperatures like Andean mining installations in Peru. We have performed relative quantification RT-qPCR on candidate genes to have a role in adaptations at low temperature (5°C). The candidate genes analyzed were six: Two trehalose synthesis pathway genes, trehalose synthase (*treS*) and malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase (*treZ*) showing no overexpression at 5°C. Two diguanylate cyclases genes related to exopolymer synthesis and biofilm formation (designated as *dgc-I* and *dgc-II* in this paper) were overexpressed at 21°C. The *rusA* and *rusB* genes involved in iron oxidation showed no significant change for *rusA* and no expression for *rusB* gene in any of both conditions. Genes *rpoC*, *gyrB* and *alaS* were validated as reference genes. These results show congruency with transcriptomics studies about gene expression of *A. ferrivorans*. Furthermore, the trehalose synthesis genes show no overexpression at low temperatures suggesting that other cold adaptation mechanisms are involved.

Introduction

Knowledge of the molecular cold adaptation mechanisms in psychrotolerant *A. ferrivorans* [1] could enable future biotechnological applications. A recent metagenomics study in bacterial mine drainage communities thriving at low temperatures showed that all the pathways required for trehalose synthesis are present, hence, these genes would play a crucial role in psychrotolerance and osmoregulation [2]. Biofilm formation has been proposed as a mechanism for cold adaptation [3], biofilm formation and substrate adherence are mediated by the cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP) produced by diguanylate cyclase genes [4]. Levels of iron oxidation proteins increase at low temperature being involved in cold adaptation in *A. ferrivorans* [5,6]. The aim of this study was to analyze the expression of these genes, which are presumed to have a role for cold adaptation, under low temperature condition (5°C) compared to nearly optimal growth (21°C).

Materials and Methods

***A. ferrivorans* PQ33 culture.** PQ33 was cultured in triplicate at 5°C and 21°C in 9K Silverman Lundgreen media: (NH₄)₂SO₄ (3 g); KCl (0.1g); K₂HPO₄ (0.5g); MgSO₄·7H₂O (0.5 g); Ca(NO₃)₂ (0.01 g); deionized water (1000 mL) and sulfuric acid added until pH of 1.6 was reached. Sterilization was achieved via 0.2 µm filter.

Primer Design and Amplification Efficiency. The sequences of the genes were obtained from genome of *A. ferrivorans* PQ33 [7], candidate reference genes were: *rpoC*, *alaS*, *gyrB* and *era*, used as reference genes in the same genus [8]. Hypothetical cold stress response genes according to literature were evaluated [2]: two genes encoding for the final enzymatic steps in trehalose synthesis pathways (*treS* and *treZ*); two metabolic gene variants for rusticyanin (*rusA* and *rusB*), and two genes encoding for diguanylate cyclases: *dgc-I* and *dgc-II*. PrimerPremier6, Oligoanalyzer, and InSilicoPCR software were used for primer design. Calibration curves using a dilution series of the cDNA pool were made to calculate the PCR amplification efficiencies: 5 ng of genomic DNA were diluted 1:10 with nuclease free water five successive times, each 20 μ L PCR reactions contained 2 μ L of the dilutions ranging from 5ng/ μ L-0.0005ng/ μ L DNA; 200 nM of each primer and 1X Power SYBR[®] Green PCR Master Mix. The cycling protocol was the same as the RT-PCR. Reactions had technical triplicates. Results were analyzed with the StepOnePlus Software.

Total RNA Isolation, Purification, cDNA Synthesis. RNA was extracted from 1×10^9 cells in mid-logarithmic phase. For both experimental conditions, three biological replicates were harvested. Cells growth at 5°C and 21°C were collected by centrifugation at 5°C and 7680g for 15 minutes. The RNA method extraction is a variation of Chen [9], using the RNAeasy mini Qiagen Kit, with an additional RNA protection step with Qiagen's RNA Protect reagent before extraction. Genomic DNA digestion was performed using Qiagen DNase and RDD digestion buffer into the column before RNA elution, two steps of DNase digestion were performed. RNA was stored at -80°C until use. The purified RNA (1 μ g/ μ L) of each sample and replicates was reverse-transcribed using Thermo Scientific First Strand cDNA Kit, cDNA was stored at -80°C.

Real Time PCR. Experiments were performed in the StepOnePlus7500 platform using the Power SYBR[®] Green PCR Master Mix. Each 20 μ L PCR reactions contained 2 μ L of 1:10 previously diluted cDNA sample; 200 nM of primer and 1X Power SYBR[®]GreenPCRMaster Mix. PCR protocol followed a denaturation step for 10 min at 95°C, 40 cycles of 30 s at 95°C; 20 s at different hybridization temperatures according to the primers, and 30 s at 72°C. Melting curve analysis was performed after PCR from 55°C and increased at 0.5°C every minute with a continuous fluorescence measurement up to 95°C. Single peaks in every amplification were observed. Expression of all genes was performed from the same cDNA batch. Triplicate reactions were performed. Reactions for negative controls were performed once per gene and no-retrotranscriptase controls were performed for every sample.

Analysis of RT-qPCR Results. Validation of reference genes was performed with GeNorm and NormFinder sheets in Microsoft Excel. The analysis of relative RT-qPCR results was carried out with the REST2009 program, 10 000 iterations of the data were used as statistic validation method.

Results

Primers efficiency. All efficiencies were greater than 88%, single peak amplification and no primer dimers were detected. Oligonucleotide sequence and parameters are listed in **Table 1**.

Validation of reference genes. Using GeNorm, *gyrB* and *rpoC* were the most stable gene pair ($M=0.370$) followed by *alaS* gene ($M=0.464$), being adequate at least 3 genes according to literature [10]. In NormFinder, the best gene pair was *alaS* and *gyrB* with a stability of 0.087. Considering these results *gyrB*, *alaS* and *rpoC* were validated for references at the conditions tested for this species.

Relative RT-qPCR. None of the analyzed and theorized genes presumed to confer cold adaptation showed overexpression at 5°C. However, at this temperature three genes reported downregulation: *treS* and the diguanylate cyclase encoding genes found in the *A. ferrivorans* PQ33 strain (Fig.1). The non-retrotranscription controls gave C_t results closer and over $C_t = 35$ (between 34 and 39). Negative controls did not give C_t values. All experimental gene C_t values were above 26.5. The under-regulation and statistic validation values are shown in Table 2.

Table 1. Oligonucleotide sequences used in this research, amplicon size (pb), efficiency (E), R value and optimal annealing temperature (Ta) are shown.

Gene	Sequence 5'-3'	Amplicon size [pb]	E [%]	R ² value	Ta[°C]
<i>gyrB</i>	F: GCTGCTGACCTTCTTCTA R: GTGTCGTCCTTGATGTAG	123	94.63	0.997	58
<i>alaS</i>	F: CATCTGCCCAAACCTCT R: GTCGGTGTCATAGTTGTTGTGT	90	94.54	0.999	54
<i>rpoC</i>	F: TTGCCGACCAGTTGATGTA R: GCCAGAATGCCCTCCTTT	106	95.90	0.999	58
<i>era</i>	F: TCAGATTCTCGGGATACT R: GACTGCGATAACCACTATG	83	94.99	0.997	56
<i>treS</i>	F: CACAATAATCCACAGGTAGTCAAG R: GTCCAGCCAGTAGCGTAG	57	94.14	1	56
<i>glgX</i>	F: CAGCATGGGATGGGAATGG R: CTTGGCATCGAACAGGCAG	83	91.97	1	56
<i>treZ</i>	F: CGTCTGTTACCAGTTCCTA R: ACGGACCTTGGGCATCTTC	86	88.72	0.999	58
<i>treY</i>	F: GGACCTACAGTCCGATGGA R: CCTGGTTTATGGCGGTTTGGA	69	90.46	0.999	58
<i>dgc-I</i>	F: CGCAACATGGATGAAGTAGA R: AGACTCGCCTGAATGCTG	100	95.08	1	58
<i>dgc-II</i>	F: ATCTCTTCTTGCCGATTA R: CTGGGATTGGTGCGTTT	71	93.88	0.997	56
<i>rusA</i>	F: TTTCCATTCCCAGCTTTGA R: TTGTTGGTGTGATGAAGGT	98	96.67	0.996	54
<i>rusB</i> *	F: GGACAGTCAGCGGTAAAAAC R: ACGTCGTGGATTTCAAAG	106	--	--	56

*RusB efficiency was not analyzed since no expression was found.

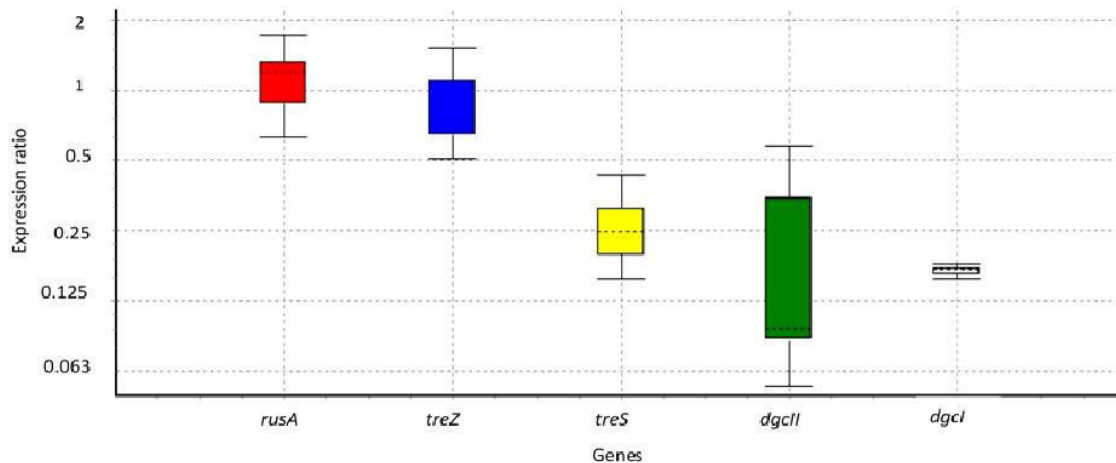


Fig. 1. Relative expression of *rusA*, *tzfV*, *treS*, *dgcII*, *dgcI* genes at 5°C compared to control of 21°C. *treS*, *dgcII*, *dgcI* genes are downregulated (expression ratio <1).

Table 2. Statistical values from the relative RT-qPCR performed for gene expression at 5°C vs control at 21°C, 10000 iterations were used. Software: REST2009, Pvalue (H1) < 0.05 indicates different control and treatment genetic expressions.

Gene	Type	Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	Pvalue (H1)	Result
<i>gyrB</i>	REF	0.9463	0.960				
<i>alaS</i>	REF	0.9454	0.750				
<i>rpoC</i>	REF	0.9390	1.388				
<i>rusA</i>	TRG	0.9667	1.904	0.804-1.484	0.663-1.680	0.732	
<i>treZ</i>	TRG	0.8872	0.829	0.599-1.225	0.524-1.473	0.432	
<i>treS</i>	TRG	0.9414	0.250	0.188-0.320	0.160-0.410	0.037	Down
<i>dgcII</i>	TRG	0.9388	0.144	0.067-0.497	0.055-0.574	0.000	Down
<i>dgcI</i>	TRG	0.9508	0.169	0.162-0.178	0.155-0.179	0.033	Down

Discussion

Trehalose synthesis genes showed no variation in expression between tested temperatures. This result reinforces previous data [5], suggesting that this species do not use trehalose as a cold adaptation mechanism. Moreover, *rusA* showed no changes in expression for PQ33 strain, contrary to other works [5,6]. A variable expression of this gene in different strains indicates a diversity of mutations in the *rusA* gene or other iron oxidation-related and regulation genes. These ones may be involved in the variation of transcription level and thus show different metabolic efficiencies.

On the other hand, diguanylate cyclase transcripts were more abundant at control conditions. The existence of several diguanylate cyclase encoding genes in bacterial genomes is widely known [4], there are several induction pathways known for their transcription. The higher abundance of diguanylate cyclase transcripts in control conditions compared to 5°C could be explained by the quorum sensing role that this molecule has during exponential growth of the strain at optimal conditions. The faster iron oxidation and iron increasing concentrations during the growth at optimal culture conditions may be the reason why this *treS* gene transcript are more abundant at 21°C.

Acknowledgements

This research was financially supported by Innovate Peru (Grant No. 188-FINCYT-IB-2013).

References

- [1] K.B. Hallberg, E. Gonzales-Toril, D.B. Johnson, *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments, *Extremophiles* 14 (2010) 9-19.
- [2] M. Liljeqvist, F. Ossandon, C. González, S. Rajan, A. Stell, J. Valdes, D. Holmes, M. Dopson, Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream, *FEMS Microbiol. Ecol.* 91 (2015).
- [3] C.A. Mancuso Nichols, S. Garon, J.P. Bowman, G. Raguénès, J. Guézennec, Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates, *J. Appl. Microbiol.* 96 (2004) 1057–1066.
- [4] M. Castro, L.M. Ruíz, A. Barriga, C.A. Jerez, D.S. Holmes, N. Guiliani, C-di-GMP Pathway in Biomining Bacteria, *Adv. Mater. Res.* 71-73 (2009) 223-226.
- [5] S. Christel, J. Fridlund, E.L. Watkin, *Acidithiobacillus ferrivorans* SS3 presents little RNA transcript response related to cold stress during growth at 8°C suggesting it is a eurypsychrophile, *Extremophiles* 20 (2016) 903, doi:10.1007/s00792-016-0882-2.
- [6] N. Mykytzc, J. Trevors, S. Foote, L. Leduc, G. Ferroni, S. Twine, Proteomic insights into cold adaptation of psychrotrophic and mesophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains, *Anton. Leeuw.* 100 (2011) 259–277.
- [7] R. Ccorahua-Santo, A. Eca, M. Abanto, G. Guerra, P. Ramírez, Physiological and comparative genomic analysis of *Acidithiobacillus ferrivorans* PQ33 provides psychrotolerant fitness evidence for oxidation at low temperature, *Res. Microbiol.* 168 (2017) 482–492.
- [8] P. Nieto, P. Covarrubias, E. Jedlicki, D. Holmes, R. Quatrini, Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *BMC Mol. Biol.* 10 (2009) 63.
- [9] L. Chen, Y. Ren, J. Lin, X. Liu, X. Pang, J. Lin, *Acidithiobacillus caldus* sulfur oxidation model based on transcriptome analysis between the wild type and sulfur oxygenase reductase defective mutant, *PLoS ONE* 7(9) (2012) e39470, doi: 10.1371/journal.pone.0039470.
- [10] Primer design Ltd. geNorm™ and geNormPLUSTM Reference Gene Selection Kit, information on: http://www.primerdesign.co.uk/assets/files/genorm_sybrgreen_handbook.pdf